

Aus dem Institut für Parasitologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Kryptosporidiose der Kälber: Studien zu Prävalenz, Virulenz und Inaktivierung des
Erregers**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Ivette Holzhausen
aus Borna

Leipzig, 2020

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Arwid Dauschies

Gutachter: Prof. Dr. Arwid Dauschies

Institut für Parasitologie

Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Dr. habil. Christine Klaus

Friedrich-Loeffler-Institut, Jena

Tag der Verteidigung: 17.12.2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Taxonomie des Erregers.....	3
2.2	Morphologie und Entwicklungszyklus intestinaler Kryptosporidien.....	4
2.3	In-vitro-Kultivierung des Erregers	5
2.4	Invasionsmechanismen und Modulation der Apoptose	6
2.5	Klinik, Pathogenese und Bekämpfung von <i>C. parvum</i> beim Kalb	7
2.6	Humane Kryptosporidiose	9
2.7	Diagnostik und molekulargenetische Charakterisierung von Feldisolaten	10
2.8	Viabilitäts- und Infektiositätsnachweis von <i>C. parvum</i> -Oozysten.....	16
2.8.1	Bewertung der Viabilität.....	16
2.8.2	Bewertung der Infektiosität.....	18
2.9	Inaktivierung des Parasiten	20
2.9.1	Physikalische Inaktivierung	20
2.9.1.1	Temperatur	20
2.9.1.2	UV-Bestrahlung	22
2.9.1.3	Gammastrahlung	24
2.9.1.4	Ultraschall	25
2.9.1.5	Sonstige Methoden der physikalischen Inaktivierung	25
2.9.2	Chemische Inaktivierung	26
2.9.2.1	Chlorverbindungen.....	27
2.9.2.2	Ozon.....	28
2.9.2.3	Alkohole und Aldehyde	29
2.9.2.4	Ammoniumverbindungen	29
2.9.2.5	Wasserstoffperoxid	30
2.9.3	Kommerziell erhältliche Desinfektionsmittel	31
3	Publikation 1: Inactivation of <i>Cryptosporidium parvum</i> under laboratory conditions	33
4	Publikation 2: Distribution of <i>Cryptosporidium parvum</i> gp60 subtypes in calf herds of Saxony, Germany	34

Inhaltsverzeichnis

5	Publikation 3: Bovine <i>Cryptosporidium parvum</i> field isolates differ in cytopathogenicity in HCT-8 monolayers	35
6	Diskussion	36
6.1	Chemische Desinfektion von <i>C. parvum</i> unter Laborbedingungen	36
6.2	Physikalische Inaktivierung von <i>C. parvum</i> mittels UV-Bestrahlung	39
6.3	Nachweisraten von <i>Cryptosporidium</i> spp. in Sachsen	42
6.4	Zytopathogenität der <i>C. parvum</i> -Feldisolate	44
6.5	Verbreitung von <i>Gp60</i> -Subtypen in Sachsen	49
7	Zusammenfassung	53
8	Summary	55
9	Literaturverzeichnis	57

Abkürzungsverzeichnis

Liste der Abkürzungen:

AIDS	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i> - Erworbenes Immunschwächesyndrom
Ak	Antikörper
BKI	<i>Bumped kinase inhibitor</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
<i>C. andersoni</i>	<i>Cryptosporidium andersoni</i>
<i>C. bovis</i>	<i>Cryptosporidium bovis</i>
CEN	<i>Comité Européen de Normalisation</i> - Europäisches Komitee für Normung
<i>C. hominis</i>	<i>Cryptosporidium hominis</i>
<i>C. muris</i>	<i>Cryptosporidium muris</i>
<i>C. parvum</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
<i>C. ryanae</i>	<i>Cryptosporidium ryanae</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
DVGW	Deutscher Verein des Gas- und Wasserfachs
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. tenella</i>	<i>Eimeria tenella</i>
EIA	Enzymatisches Immunadsorptionsverfahren
FKS	Fetales Kälberserum
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus

Abkürzungsverzeichnis

HOCl	Hypochlorige Säure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IL-8	Interleukin 8
LDH	Laktatdehydrogenase
MIOX	<i>Mixed oxidants</i>
MLFT	<i>Multilocus fragment typing</i>
MLG	<i>Multi locus genotypes</i>
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NaOCl	Natriumhypochlorit
NH ₃	Ammoniak
NF	Nekrosefaktor
OCl	Salz der hypochlorigen Säure
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - Polymerasekettenreaktion
p.i.	<i>Post infectionem</i>
PI	Propidiumiodid
PMA	Propidium-Monoazid
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
SNP	<i>Single nucleotid polymorphism</i> - Einzelnukleotidpolymorphismus
spp.	<i>Spezies pluralis</i>
USA	United States of America
UV	Ultraviolett
z. B.	Zum Beispiel

1 Einleitung

Kryptosporidien sind einzellige parasitäre Erreger mit ubiquitärer Verbreitung, welche sowohl in der Tiermedizin als auch in der Humanmedizin als Primärpathogen des neonatalen Durchfalls und bei Patient/en/innen mit geschwächtem Immunstatus eine schwere bis lebensbedrohliche Erkrankung verursachen können (RYAN und HIJJAWI, 2015). In Entwicklungsländern stellen sie neben Rotaviren eine der häufigsten Ursachen für Durchfall mit Todesfolge bei unter fünfjährigen Kindern dar (KOTLOFF et al., 2013; TROEGER et al., 2017). In der Nutztierhaltung sind sie aufgrund erhöhter Kälbermortalität und hoher Behandlungskosten wirtschaftlich von Bedeutung (DE GRAAF, 1999). Da sich die kausale Behandlung einer Kryptosporidiose aufgrund der begrenzten Anzahl an Therapeutika, welche den Erreger zudem nicht vollständig eliminieren und zum Teil erhebliche Nebenwirkungen oder Kontraindikationen aufweisen, als schwierig erweist, sind für die Kontrolle der Erkrankung auf Kälber haltenden Betrieben hygienische Maßnahmen einschließlich einer gezielten Desinfektion unbedingt erforderlich, wenn auch alleine oft nicht ausreichend (KEIDEL und DAUGSCHIES, 2013). In der Regel werden Desinfektionsmittel mit antiprotozoärer Wirkung angewendet, welche nach einer Prüfrichtlinie der Deutschen Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) getestet wurden. Beim gezielten Umgang mit dem Erreger in Forschungseinrichtungen und Diagnostiklaboren vermindert eine effektive Desinfektion das Risiko einer Ansteckung des Personals und ist damit ein wichtiges Element im Arbeitsschutz.

Epidemiologische Studien in Europa haben gezeigt, dass Ausbrüche humaner Kryptosporidiose oft wasser- oder lebensmittelassoziiert sind (CACCIÒ und CHALMERS, 2016) und dass die Ausscheidung einer großen Anzahl umweltresistenter Oozysten durch Nutztiere ursächlich dafür sein kann (STRATHMAN et al., 2016). Unter den zahlreichen anerkannten Spezies der Gattung *Cryptosporidium* sind *C. parvum* und *C. hominis* besonders relevant (ZAHEDI et al., 2016). Die molekulargenetische Charakterisierung von Isolaten dieser Spezies ist ein wichtiger Schritt zur Erstellung von Verbreitungsstrukturen und zur Verfolgung möglicher Infektionswege im Sinne eines One-Health-Ansatzes. Für den Landwirt/die Landwirtin und den betreuenden Tierarzt/die betreuende Tierärztin steht nach einem Nachweis des Parasiten im Kot jedoch vor allem die klinische Relevanz einer Kryptosporidien-Infektion im Fokus. Die Infektion kann subklinisch verlaufen, durch eine Vielzahl anderer Einflussfaktoren auf dem Betrieb (z. B. andere Darmpathogene, Kolostrummanagement, Umstellungsstress) aber auch massiven wässrigen Durchfall und entsprechende Folgesymptomatik auslösen. Der Parasit hat je nach Isolat wahrscheinlich eine unterschiedliche Virulenz, was auch zur variablen Schwere der Symptome beitragen könnte (FAYER und UNGAR, 1986). Pathologisch zeigt sich die Kryptosporidiose im Wesentlichen in einer Abstoßung von Darmepithelzellen, Villusverkürzung und Kryptenhyperplasie (HEINE et al., 1984b). Voraussetzung dafür ist die

1 Einleitung

Invasion von *C. parvum* in die Wirtszelle. Dieser Vorgang kann in der Zellkultur sehr gut nachvollzogen werden (HIJJAWI et al., 2001; HUANG et al., 2004).

In den vorliegenden Studien wurden verschiedene Laborchemikalien und die Bestrahlung mit ultraviolettem (UV) Licht auf die Wirksamkeit gegen *C. parvum*-Oozysten getestet. Dadurch sollten mögliche Anwendungsoptionen für die Inaktivierung des Parasiten im Labor identifiziert werden. Des Weiteren wurden anhand von Gensequenzanalysen des *Gp60*-Genlokus *C. parvum*-Feldisolate von Kälbern aus sächsischen Milchviehbetrieben molekulargenetisch charakterisiert, sodass eine molekularepidemiologische Analyse für Sachsen nun erstmals möglich ist. Eine Auswahl an Feldisolaten wurde *in vitro* unter standardisierten Laborbedingungen in humanen Adenokarzinomzellen (HCT-8) auf Zytopathogenität als Ausdruck der Virulenz untersucht und in Bezug zu klinischen Felddaten gesetzt. Die eigenen Studien greifen insgesamt Aspekte der Epidemiologie, Virulenz und Inaktivierung von Infektionsstadien auf, die für das Verstehen und die Bekämpfung der Kälberkryptosporidiose von hoher Relevanz sein können.

2 Literaturübersicht

2.1 Taxonomie des Erregers

Vertreter der Gattung *Cryptosporidium* wurden aufgrund der Parallelen im Entwicklungszyklus jahrzehntelang den Kokzidien zugeordnet (TYZZER, 1910). Jedoch stellte TYZZER (1907) bereits bei der Erstbeschreibung der Spezies *C. muris* in Mäusen Gemeinsamkeiten mit den Gregarinen heraus. Insbesondere die epizelluläre Lage während des gesamten Entwicklungszyklus ohne eine vollständige Penetration der Wirtszellmembran unterscheidet Kryptosporidien von anderen Vertretern der Unterordnung *Coccidia* (TYZZER, 1907; POHLENZ et al., 1978). Durch die Entwicklung molekulargenetischer Methoden erhärtete sich im Laufe der Zeit die These, dass Kryptosporidien phylogenetisch eine nähere Verwandtschaft zu den Gregarinen aufweisen und mit diesen eine separate Klade bilden (CARRENO et al., 1999; ZHU et al., 2000; LEANDER et al., 2003). BARTA und THOMPSON (2006) fassten weitere Unterschiede der Kryptosporidien zu den Kokzidien zusammen (z.B. dünn- und dickwandige Oozysten, Fehlen der Mikropyle, Fehlen des Apikoplasten, Resistenz gegenüber vieler Kokzidiostatika) und forderten eine Neuklassifizierung der Kryptosporidien innerhalb der Apicomplexa. Dies wurde von CAVALIER-SMITH (2014) umgesetzt, indem der Autor eine neue Unterklasse, *Cryptogregarina*, mit der Gattung *Cryptosporidium* als bisher einzigen Vertreter deklarierte.

Im Laufe der Jahre wurden Kryptosporidien in einer Vielzahl von Wirtstieren entdeckt. Aufgrund fehlender Kriterien für die Speziesdifferenzierung wurden zahlreiche Parasiten als neuer Genotyp der Gattung *Cryptosporidium* beschrieben und nach dem Wirt, aus dem sie isoliert wurden, benannt (XIAO et al., 2004). Insbesondere durch molekulargenetische Studien wurde vielen dieser Genotypen später der Speziesstatus zuerkannt, sodass die Anzahl anerkannter Spezies innerhalb der Gattung *Cryptosporidium* ständig zunimmt. Z. B. wurde der vorher als *C. parvum* Genotyp I bekannte Parasit anhand der molekularen und biologischen Unterschiede als separate Spezies *C. hominis* postuliert (MORGAN-RYAN et al., 2002). *C. andersoni* wurde ursprünglich *C. muris* zugeschrieben und erst im Jahr 2000 als eigene Spezies deklariert (LINDSAY et al., 2000). Auch *C. bovis*, ehemals „*Cryptosporidium* genotype bovine B“ (FAYER et al., 2005), und *C. ryanae*, vorher „*Cryptosporidium* deer-like genotype“ (FAYER et al., 2008), erlangten kürzlich Speziesstatus.

Momentan sind fast 40 valide *Cryptosporidium* spp. bekannt (KVÁČ et al., 2018; HORČIČKOVÁ et al., 2019), wobei *C. hominis* und *C. parvum* wohl am bedeutendsten sind (ZAHEDI et al., 2016). Mit der Klassifizierung von Subgenotypen bzw. Subtypen wird Rücksicht auf molekulargenetische Unterschiede innerhalb einer Kryptosporidien-Spezies genommen (XIAO et al., 2004).

2.2 Morphologie und Entwicklungszyklus intestinaler Kryptosporidien

Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts war TYZZER (1907; 1910) in der Lage, mit Hilfe der Lichtmikroskopie den Entwicklungszyklus des Parasiten im Wirt nachzuvollziehen (TZIPORI und WIDMER, 2008). CURRENT und REESE (1986) veröffentlichten jedoch erst Jahrzehnte später das bis heute akzeptierte Modell eines kompletten Entwicklungszyklus der Kryptosporidien in artifiziiell infizierten Mäusen.

Der Lebenszyklus der Kryptosporidien beinhaltet asexuelle (Zellkernteilung) und sexuelle Entwicklungsstadien, die hauptsächlich in den Mikrovilli des Ileums und Jejunums aufzufinden sind (SANFORD und JOSEPHSON, 1982). Die Infektion eines Wirtes erfolgt durch die orale Aufnahme von Oozysten aus der Umwelt. Aus der Oozyste werden über eine Sollbruchstelle in der Oozystenwand vier kommaförmige Sporozoiten mit einem abgerundeten (posterior) und einem zugespitzten (anterior) Ende freigesetzt (CURRENT und REESE, 1986). Es entsteht ein kugelig geformter Trophozoit, welcher sich im Zuge der asexuellen Merogonie zu zwei verschiedenen Meronten-Typen weiterentwickelt. Meronten des Typ I enthalten sechs bis acht Merozoiten und durchlaufen eine zyklische Merogonie zur Generierung weiterer Entwicklungsstadien dieses Typs. Typ-II-Meronten enthalten vier Merozoiten und differenzieren sich zu geschlechtlichen Mikrogamonten mit bis zu 16 spermienähnlichen Mikrogameten und zu Makrogamonten. Aus der Verschmelzung von Mikrogamet und Makrogamont resultiert eine Zygote, welche eine Sporogonie durchläuft. Aus der Zygote entwickelt sich eine Oozyste mit vier Sporoblasten, die *in situ* zu Sporozoiten sporulieren (FAYER und UNGAR, 1986). Ca. 20 % der Oozysten besitzen keine Oozystenwand, sondern lediglich eine Membran. Die Freisetzung von Sporozoiten aus diesen „dünnwandigen“ Oozysten erfolgt bereits im Darmlumen, was zur Autoinfektion des Wirtes führt (CURRENT und REESE, 1986). Die Oozysten mit einer Oozystenwand („dickwandige Oozysten“) werden über den Kot ausgeschieden und stellen wiederum eine Infektionsquelle für andere empfängliche Wirte dar (FAYER und UNGAR, 1986).

Die Morphologie der Oozysten ist je nach Spezies geringfügig unterschiedlich. Oozysten von *C. parvum* sind ca. 5 µm groß (FAYER und UNGAR, 1986). Die Ausscheidung kann bei experimentell infizierten Kälbern bereits drei Tage nach der Infektion erfolgen und bis zu 13 Tage andauern (FAYER et al., 1998a).

Kryptosporidien sind jedoch auch in der Lage sich in extraintestinalen Epithelien zu vermehren. *C. andersoni* befällt beispielsweise den Labmagen von Rindern (LINDSAY et al., 2000). Aber auch Lokalisationen außerhalb des Verdauungstrakts, wie die Konjunktiven des Auges (HEINE

et al., 1984a; BASKIN, 1996), der Respirationstrakt (HEINE et al., 1984a; PAVLÁSEK, 1987; MASCARÓ et al., 1994) und die Gallengänge (LÓPEZ-VÉLEZ et al., 1995) wurden beschrieben.

2.3 In-vitro-Kultivierung des Erregers

Nachdem man zunächst versuchte Kryptosporidien in Endodermalzellen der Chorioallantoismembran zu kultivieren (CURRENT und LONG, 1983), gelang WOODMANSEE und POHLENZ (1983) die Entwicklung des Parasiten in rektalen Tumorzellen des Menschen. Danach wurde eine Vielzahl verschiedener Zelllinien mit *C. parvum* infiziert, um deren Eignung zur In-vitro-Kultivierung zu testen (ARROWOOD, 2002). Es ergab sich, dass die *Madin-Darby canine kidney cells*-Zelllinie (MDCK) mit einer 90 %igen Infektionsrate (GUT et al., 1991) gut geeignet ist. In einem Vergleich dieser Zelllinie mit zehn weiteren erwies sich die Kultivierung von *Human ilioceal adenocarcinom*-Zellen (HCT-8) in RPMI-1640-Medium bei 37 °C unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 15 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure-Puffer, 2.2 g/l Natriumbikarbonat und verschiedenen Antibiotika und Antimykotika als am besten geeignet (UPTON et al., 1995). YU et al. (2000) verglichen vier verschiedene Zelllinien mit dem Ergebnis, dass Zellen eines Adenokarzinoms des menschlichen Magens (AGS) gegenüber MDCK- und HCT-8-Zellen mehr Parasitenstadien produzierten.

Voraussetzung für eine erfolgreiche Entwicklung des Erregers *in vitro* ist die Exzystierung von infektiösen Sporozoiten aus der Oozyste (HIJJAWI, 2010). Dieser Vorgang kann *in vitro* durch verschiedene Zusätze im Wachstumsmedium der Wirtszellkultur sowie durch die Veränderung der Kultivierungsbedingungen beeinflusst werden. Die Vorbehandlung der Oozysten mit Natriumhypochlorit (NaOCl) wird einerseits zur Vorbeugung mikrobieller Kontaminationen und in Kombination mit dem Gallensalz Natriumtaurocholat zur Verbesserung der Exzystierungsrate verwendet (GOLD et al., 2001; PECKOVÁ et al., 2016). ARROWOOD (2002) erklärt diese Vorbehandlung dagegen als unnötig. Eine Temperatur von 37 °C hat gegenüber einer kälteren Umgebung ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Exzystierungsrate (REDUKER und SPEER, 1985). Des Weiteren dienen eine Absenkung des pH-Wertes (pH ~ 2) und die Vorbehandlung mit Trypsin dazu, die Magenpassage nach oraler Aufnahme *in vitro* nachzuahmen, wobei diese Faktoren jedoch nicht essentiell für die Freisetzung von Sporozoiten sind (SMITH et al., 2005). Durch Zentrifugation einer infizierten Zellkultur wird ebenfalls eine Verbesserung der Infektionsrate mit *C. parvum* erreicht, weil

dadurch die Distanz zwischen Sporozoiten und Zellmonolayer verkürzt werden kann (KING et al., 2011).

Um die Biologie von Kryptosporidien während des gesamten Entwicklungszyklus erforschen zu können, ist eine Langzeitkultivierung nötig, die auch die Entwicklung einer neuen Generation von Oozysten abbildet. Dies wurde sowohl in der Zellkultur (CURRENT und HAYNES, 1984; ROSALES et al., 1993; UPTON et al., 1994; YANG et al., 1996) als auch in zellfreien Kulturen (HIJJAWI et al., 2004; ALDEYARBI und KARANIS et al., 2016) berichtet. HIJJAWI et al. (2001) gelang es *C. hominis* über 25 Tage in HCT-8-Zellen in Kultur zu halten. Auch in aktuelleren Studien gibt es vielversprechende Ansätze, die eine Erregerpassage im Tier durch Verwendung von Hohlfasern (MORADA et al., 2016) oder COLO-680N-Zellen (MILLER et al., 2018) ersetzen könnten. Eine Reproduktion der in diesen Studien berichteten Ergebnisse durch andere Arbeitsgruppen war bisher jedoch nicht erfolgreich.

2.4 Invasionsmechanismen und Modulation der Apoptose

Die Anheftung der vom Wirt aufgenommenen Oozyste an die gastrointestinale Epithelzelle erfolgt durch N-acetyl-galaktosamin-haltige Moleküle auf der Oozystenoberfläche (STEIN et al., 2006). Nach der Freisetzung der Sporozoiten führen diese zirkuläre und helikale Bewegungen aus, die im Englischen als *gliding motility* bezeichnet werden und heften sich dann mit dem anterioren Ende an die Wirtszelle (WETZEL et al., 2005). HUANG et al. (2004) beschrieben die Vorgänge während der Invasion von *C. parvum* in die Wirtszelle mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskops ausführlich. Während der Phase der Anheftung werden wichtige sekretorische Organellen (*micronemes*, *dense granules*, *rhoptry*) in die Apikalregion des Sporozoiten verlagert und es bilden sich zahlreiche Vakuolen, die im akkumulierten Zustand letztlich die parasitophore Vakuole darstellen. Außerdem bewirkt der Kontakt zwischen Sporozoit und Wirtszelle eine Modulation der Wirtszellmembran, wodurch die Bildung eines „parasitophoren Sackes“ initiiert wird. Diese kreisrunde Membranfalte umschließt das apikale Ende des Sporozoiten fast vollständig (VALIGUROVÁ et al., 2008). Zwischen den Zytoplasmen des Parasiten und der Wirtszelle befindet sich eine Art Membran (*dense band*), die zu der Lagebezeichnung „intrazellulär, aber extrazytoplasmatisch“ geführt hat (HUANG et al., 2004). Diese Anheftungsstrategie und die daraus resultierende epizelluläre Lage ist dem Invasionsprozess der Gregarinen sehr ähnlich (VALIGUROVÁ et al., 2007).

Bakterien, Viren und Parasiten können während der Infektion die Apoptose der Wirtszelle modulieren, um die Verbreitung von intrazellulären Erregern in einem Wirt zu erhöhen, der Immunantwort des Wirtes zu entgehen oder das intrazelluläre Überleben des Pathogens zu

ermöglichen (LÜDER et al., 2001). CHEN et al. (1998) sahen morphologische Veränderungen des Zellkerns in Verbindung mit Apoptose 48 h nach Inkubation von Epithelzellen der menschlichen Gallenblase (H69) mit *C. parvum*-Sporozoiten. Bei der Erforschung der Signalwege während der Apoptose beobachteten CHEN et al. (1999; 2001) eine parakrin und autokrin vermittelte Apoptose durch die Aktivierung des Fas-Rezeptors und des Fas-Liganden (CHEN et al., 1999). Außerdem führt die Infektion mit *C. parvum* durch die Aktivierung von Nekrosefaktor (NF)- κ B 24 h p. i. zu einer Apoptoseinhibition, wobei benachbarte Zellen, die nicht selbst infiziert sind, durch die Ausschüttung von Interleukin 8 (IL-8) der Apoptose unterliegen (CHEN et al., 2001). Dieses Phänomen wurde von McCOLE et al. (2000) auch in intestinalen Zelllinien (HCT-8, Caco-2) beschrieben. MELE et al. (2004) konnten mit der Messung der Caspase-3-Aktivität zeigen, dass bereits zu Beginn der Bildung der parasitophoren Vakuole, 2 h p. i. und 6 h p. i., in HCT-8 Zellen Apoptose ausgelöst wird. Anhand von Genexpressionsprofilen während einer *C. parvum*-Infektion *in vitro* geht man von einer biphasischen Modulation der Apoptose aus. LIU et al. (2009) berichteten von einer Unterdrückung apoptotischer Signaltransduktionswege in frühen Stadien der Infektion, um eine Entwicklung bis zum Meronten-Stadium zu gewährleisten, und von einer vermehrten Expression proapoptotischer Gene 48 h p. i. und 72 h p. i., womit eine Freisetzung der Merozoiten zur Infektion anderer Enterozyten ermöglicht wird. ELLIOT und CLARK (2003) sahen den Verlust der Membranintegrität nach Austritt von Parasitenstadien als ursächlich für den Zelltod. KARANIS und ALDEYARBI (2011) vermuten deshalb, dass beide Mechanismen zum Tod der Wirtszelle führen.

2.5 Klinik, Pathogenese und Bekämpfung von *C. parvum* beim Kalb

Kryptosporidien können eine Vielzahl von Wirbeltierarten befallen (CHALMERS und KATZER, 2013). Im Jahr 1971 wurde der Parasit erstmals mikroskopisch im Darm eines Kalbes im Zusammenhang mit einer Villusverkürzung nachgewiesen (PANCIERA et al., 1971). Rinder können sich altersabhängig mit vier bekannten Kryptosporidien-Spezies infizieren. *C. andersoni* befällt vorrangig adulte Tiere, *C. bovis* und *C. ryanae* sind eher in Absatzkälbern zu finden (FAYER et al., 2006; SANTÍN et al., 2008). Am bedeutendsten für die Tiermedizin ist jedoch *C. parvum* in neonatalen Kälbern. Natürlich infizierte Tiere können eine große Zahl von Oozysten ausscheiden (laut NYDAM et al., 2001, bis zu $8 \cdot 10^5$ Oozysten/g Kot), die eine hohe Umweltresistenz aufweisen, sodass sich wahrscheinlich alle Kälber in einem betroffenen Bestand mit Kryptosporidien infizieren (SANTÍN et al., 2008). Im Zuge der entzündlichen Vorgänge im Darm kommt es vor allem im Ileum und Jejunum zur Verkürzung des Bürstensaums, zu Villusatrophie und -fusion und zu Kryptenhyperplasie (HEINE et al., 1984b).

2 Literaturübersicht

Eine Infektion kann subklinisch verlaufen, infolge der pathohistologischen Veränderungen aber auch profusen, wässrigen Durchfall mit entsprechender Folgesymptomatik (Dehydratation, Inappetenz, Lethargie) verursachen. Sind andere Enteropathogene am Durchfallgeschehen beteiligt, sind die Symptome meist noch ausgeprägter (GÖHRING et al., 2014). Durch einen negativen Einfluss auf die Körpergewichtszunahme des Kalbes (WINDEYER et al., 2014; SHIVLEY et al., 2018), eine erhöhte Mortalität (DE GRAAF et al., 1999) und zusätzlich anfallende Behandlungskosten kann Kälberdurchfall zu beachtlichen ökonomischen Verlusten führen (KANEENE und HURD, 1990).

Kryptosporidien sind gegen die meisten Kokzidiostatika resistent und die Möglichkeiten zur kausalen Therapie sind sehr limitiert. In Deutschland sind nur Halocur[®] und Halagon[®] mit dem Wirkstoff Halofuginonlaktat zur Behandlung der bovinen Kryptosporidiose zugelassen. Halofuginonlaktat verzögert und reduziert die Ausscheidung von Oozysten und führt zu einer Verbesserung des Gesundheitsstatus (JARVIE et al., 2005; LEFAY et al., 2001). Durch die metaphylaktische Behandlung über sieben aufeinanderfolgende Tage wird der Erreger jedoch nicht vollständig eliminiert, sodass ohne effiziente Desinfektion über die gesamte Aufzuchtphase hinweg die Ausscheidung infektiöser Oozysten gegenüber unbehandelten Tieren ab der dritten Lebenswoche sogar erhöht sein kann (KEIDEL und DAUGSCHIES, 2013). Außerdem hat das Molekül eine geringe therapeutische Breite und bei einer zu späten Anwendung (Kälber, die bereits länger als 24 h Durchfall zeigen) ist ein angestrebter Behandlungserfolg nicht zu erwarten. Unter experimentellen Bedingungen konnte mit Paromomycin eine Elimination des Erregers erst bei einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht erreicht werden (FAYER und ELLIS, 1993). Paromomycin gehört zur Gruppe der Aminoglykosidantibiotika und ist in Deutschland nur zur Behandlung von durch *E. coli* verursachtem Durchfall zugelassen. Neuere Studien mit Substanzen, die eine kalziumabhängige Proteinkinase der Kryptosporidien hemmen (BKIs), zeigen vielversprechende Ergebnisse bezüglich der Wirkung auf *C. parvum* in experimentell infizierten Kälbern (LENDNER et al., 2015; SCHAEFER et al., 2016).

Im Gegensatz zu pharmakologisch wirksamen Substanzen bieten Vakzine die Möglichkeit der nachhaltigen Prävention gegen den Erreger ohne die Gefahr von Rückständen im Tier und in der Umwelt (INNES et al., 2011). Des Weiteren ist die Ausbildung von Resistenzen, die beispielsweise beim Einsatz von Kokzidiostatika im Geflügel ein Problem darstellen (CHAPMAN et al., 2010), nicht zu erwarten.

Durch die Verabreichung von Oozysten, die mittels Gammabestrahlung (400 Gy) behandelt wurden, erreichten JENKINS et al. (2004) eine hinreichende Immunisierung von Kälbern. Die Tiere zeigten nach experimenteller Infektion mit 10^5 *C. parvum*-Oozysten 20 Tage nach der Vakzination keine Klinik und nur zum Teil Oozystenausscheidung. Ein Kalb kann sich bereits

kurz nach der Geburt auf natürliche Weise mit Kryptosporidien infizieren. Die aktive Immunisierung (experimentelle Infektion mit bestrahlten Oozysten) muss entsprechend des Lebenszyklus des Parasiten jedoch einige Zeit vor der natürlichen Infektion erfolgen, damit das Tier eine kompetente Immunantwort ausbilden kann (INNES et al., 2011). Die Anwendung der aktiven Vakzination unter Feldbedingungen war daher nicht erfolgreich (THOMSON et al., 2017). PERRYMAN et al. (1999) verfolgten einen anderen Ansatz. Die Autoren verabreichten Kälbern Kolostrum von Kühen, welche mit einem *C. parvum*-Antigen (rC7) dreimal im Abstand von zwei Wochen immunisiert wurden. Diese Kälber schieden signifikant weniger Oozysten nach experimenteller Infektion aus und erkrankten im Vergleich zu infizierten Kontrollkälbern, die Kolostrum von nicht immunisierten Kühen erhielten, nicht an Durchfall. Erfolgreich war auch die Verabreichung von Kolostrum von Kühen, die viermal im Abstand von drei Wochen mit einem ähnlichen rekombinanten Protein (P23) immunisiert wurden, an experimentell mit *C. parvum* infizierte Kälber (ASKARI et al., 2016). BURTON et al. (2011) konnten nach Vakzinierung von Färsen mit dem rekombinanten CP15/60-Antigen signifikant erhöhte Serumantikörper-Werte bei Kälbern feststellen, wenn diese Kolostrum der immunisierten Färsen erhielten. Trotz dieser ermutigenden Ergebnisse und der Identifizierung weiterer möglicher Vakzinogene (MANQUE et al., 2011), gibt es bisher keine zugelassene Vakzine zur Prävention der Kryptosporidiose (THOMSON et al., 2017).

Aufgrund der begrenzten Therapieoptionen und fehlender Impfstoffe stehen in der Nutztierhaltung das Reinigungs- und Desinfektionsmanagement im Vordergrund, um eine Kontamination der Umwelt mit Oozysten so gering wie möglich zu halten. Da Nutztiere, insbesondere Rinder, ein wichtiges Reservoir für die zoonotische Übertragung von *C. parvum* darstellen (HUNTER und THOMPSON, 2005), minimieren Maßnahmen zur Bekämpfung auch das Risiko einer Infektionsquelle für den Menschen.

2.6 Humane Kryptosporidiose

Für Infektionen beim Menschen sind zumeist *C. hominis* und *C. parvum* verantwortlich (CACCIÒ und CHALMERS, 2016). Gefährdet sind insbesondere unterernährte Kleinkinder und Patient/en/innen mit HIV-Infektion oder anderen Erkrankungen, die zu einer Unterdrückung des Immunsystems führen (HUNTER und NICHOLS, 2002). In afrikanischen und asiatischen Entwicklungsländern wurden Kryptosporidien als zweithäufigste Erreger in Stuhlproben von Kindern unter zwei Jahren mit mittlerem bis schwerem Durchfall detektiert und als Ursache erhöhter Sterblichkeit benannt (KOTLOFF et al., 2013). Auch global gesehen sind Kryptosporidien erheblich an Durchfallerkrankungen mit Todesfolge bei Kindern unter fünf

Jahren beteiligt (TROEGER et al., 2017). In Europa kam es in den letzten zehn Jahren immer wieder zu Ausbrüchen von Kryptosporidiose (CACCIÒ und CHALMERS, 2016). Dabei konnten kontaminiertes Trinkwasser (WIDERSTRÖM et al., 2014), Swimmingpoolwasser (McCANN et al., 2014) und Lebensmittel (McKERR et al., 2015; ÅBERG et al., 2015), aber auch der direkte Kontakt zu Kälbern in Zusammenhang mit mangelnder Hygiene als Ansteckungsquellen identifiziert werden (KINROSS et al., 2015). In Deutschland sind seit 2013 alle Fälle humaner Kryptosporidiose meldepflichtig. Anhand dieser Daten wurden im Jahr 2017 1707 Fälle humaner Kryptosporidiose festgestellt, was einer Inzidenz von 2,1 % entspricht (RKI, 2018b). Da insbesondere bei erwachsenen Durchfallpatient/en/innen jedoch nicht routinemäßig auf *Cryptosporidium* getestet wird, muss von einer Unterschätzung der Kryptosporidiose in dieser Altersgruppe ausgegangen werden (RKI, 2018a).

In der Humanmedizin wird Nitazoxanid zur kausalen Therapie der Kryptosporidiose eingesetzt. Dieser Wirkstoff ist in Europa jedoch nicht zugelassen und darf in den USA nur bei Patient/en/innen, die ein Jahr oder älter sind, eingesetzt werden. Da das Immunsystem des Wirtes bei der Manifestation einer klinischen Kryptosporidiose eine entscheidende Rolle spielt, konnten durch die Entwicklung der antiretroviralen Therapie bei HIV-infizierten Personen teilweise Erfolge hinsichtlich der Bekämpfung einer Kryptosporidien-Infektion erzielt werden (SPARKS et al., 2015). Obwohl eine Wirksamkeit gegen Kryptosporidien für weitere Wirkstoffe (z.B. Paromomycin, Azithromycin, Rifamycine) *in vivo* bereits gezeigt werden konnte (SPARKS et al., 2015), bedarf die Bewertung dieser Substanzen bezüglich der effektiven Bekämpfung der humanen Kryptosporidiose weiterer Studien. Auch in der Humanmedizin stehen also die symptomatische Therapie und Maßnahmen zur Infektionsvermeidung im Vordergrund.

Insbesondere bei *C. parvum* handelt es sich um einen Erreger mit zoonotischem Potential, bei dem die direkte Infektion des Menschen durch ein Oozysten ausscheidendes Tier oder die Kontamination der Umwelt durch Oozysten haltigen Tierkot nicht unerhebliche Aspekte der Epidemiologie darstellen. Daher erfordert die Bekämpfung des Parasiten die Berücksichtigung aller Bereiche (One-Health-Konzept) und die Zusammenarbeit von bzw. den Wissensaustausch zwischen Veterinärmedizin, Humanmedizin und Umweltwissenschaften (PLUTZER et al., 2018).

2.7 Diagnostik und molekulargenetische Charakterisierung von Feldisolaten

Der Diagnose „enterale Kryptosporidiose“ muss immer die Detektion von Oozysten im Kot des jeweiligen Wirtes vorausgehen. Eine mikroskopische Standard-Färbemethode ist die

modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbung (CASEMORE et al., 1984). Des Weiteren wird die sogenannte Heine-Färbung (HEINE, 1982), bei welcher der Kot mit Karbolfuchsin angefärbt wird, in Laboren zum Nachweis von Oozysten verwendet (JOACHIM et al., 2003b; RAUE et al., 2017). Kommerziell erhältliche Kits, die *Cryptosporidium*-Antigene mittels enzymatischer Immunadsorptionsverfahren (EIA) nachweisen, ermöglichen eine einfache und schnelle Diagnose vor Ort.

Höhere Sensitivitäten und Spezifitäten weisen jedoch Methoden auf, die auf dem Nachweis von Desoxyribonukleinsäure (DNA) mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) beruhen (KHAN et al., 2018). Verschiedene Genloki (z. B. *SSU rRNA*, *COWP*, *hsp70* und *gp60*) wurden identifiziert, um in Kot- oder Umweltproben mit entsprechenden Primerpaaren Kryptosporidien nachweisen zu können. Da *Cryptosporidium* spp. sich in der DNA-Sequenz dieser Genmarker unterscheiden, können sie zur Speziesdifferenzierung herangezogen werden, wenn die PCR-Produkte anschließend mittels Restriktionsenzymen einem Verdau unterzogen werden (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus, RFLP) oder eine Sequenzierung erfolgt (KHAN et al., 2018).

XIAO et al. (1999a; b) entwickelten ein RFLP-Verfahren mit zwei Restriktionsenzymen (*SspI*, *Vsp I*), mit welchem es möglich ist *C. parvum* von *C. hominis* (ehemals *C. parvum* Genotyp I) und andere *Cryptosporidium* spp. anhand der Bandenmuster zu unterscheiden. Für die Differenzierung relevanter Spezies beim Rind führten FENG et al. (2007) erstmals ein RFLP-Verfahren mittels des Enzyms *MboII* durch.

Um Sequenzveränderungen kurzer Abschnitte der DNA, auch als Minisatelliten und Mikrosatelliten bezeichnet, oder einzelner Nukleotide (Einzelnukleotidpolymorphismus, SNP) zu detektieren, die innerhalb der gleichen Spezies der Identifikation von Subtypen dienen können, ist eine Sequenzierung der PCR-Produkte nötig. In populationsgenetischen Studien wird häufig der Genmarker *gp60* (auch *Cpgp15/40* genannt) zur Subtypisierung von *Cryptosporidium* spp. verwendet (CHALMERS et al., 2018; KHAN et al., 2018). Er codiert für ein 60 kD schweres Glykoprotein, welches sich auf der Oberfläche des *Cryptosporidium*-Sporozysten befindet und für dessen Motilität sowie bei der Adhäsion an die Wirtszelle eine wichtige Rolle spielt (STRONG et al., 2000). Die Nukleinsäuresequenz von *gp60* enthält eine Abfolge der drei Trinukleotide TCA, TCG, TCT, die für die Aminosäure Serin codieren. Diese Abfolge variiert innerhalb derselben *Cryptosporidium* spp. sehr stark (STRONG et al., 2000). Nach Häufigkeit der einzelnen Serin-codierenden Trinukleotide und der angrenzenden ACATCA-Sequenz entwickelten SULAIMAN et al. (2005) eine Nomenklatur zur Benennung der Subtypgruppe und des jeweiligen Subtyps.

2 Literaturübersicht

Basierend auf dieser Nomenklatur sind für *C. parvum* bisher 20 Subtypgruppen identifiziert wurden, die in die Klassen IIa bis IIt eingeordnet wurden. Für *C. hominis* sind zehn Subtypen der Klassen Ia bis Ik bekannt (MISIC und ABE, 2007; XIAO und FENG, 2017). Die Subtypen IIaA15G2R1 (*C. parvum*; FENG et al., 2013) und IIaA10G2 (*C. hominis*; LI et al., 2013) sind sehr weit verbreitet. Die Unterschiede in der *Gp60*-Gensequenz spiegeln sich in der Wirtsadaptation des Parasiten wider. *C. parvum* IIa wird demnach sehr häufig in Rindern gefunden. Tabelle 1 zeigt eine Auswahl der in Europa detektierten *C. parvum* IIa in diesem Wirt. Die Subtypgruppe IIc ist eher in Schafen und Ziegen verbreitet und IIc verursacht für gewöhnlich Infektionen im Menschen (XIAO und FENG, 2017). Außerdem weisen einige Studien über humane Infektionen von *C. hominis* (CAMA et al., 2007; 2008; IQBAL et al., 2011; FENG et al., 2012) und *C. parvum* (DEL CHIERICO et al., 2011) darauf hin, dass Zusammenhänge zwischen dem Subtyp und dem klinischen Bild der Kryptosporidiose bestehen.

Tabelle 1: *Gp60*-Subtypen der Subtypgruppe IIa von *C. parvum* in Kotproben von Rindern in Europa

Land	<i>Gp60</i> -Subtyp	Nachweisraten ^a	Referenz
Portugal	IIaA15G2R1	61/72 Proben	ALVES et al., 2006
	IIaA16G2R1	7/72	
Belgien	IIaA15G2R1	84/90 Proben	GEURDEN et al., 2007
	IIaA16G2R1	3/90	
	IIaA13G2R1, IIaA14G2R1	1/90	
Serbien	IIaA16G1R1b	3/8 Betriebe	MISIC und ABE, 2007
	IIaA18G1R1, IIaA20G1R1	1/8	
Ungarn	IIaA16G1R1	15/21 Proben	PLUTZER und KARANIS, 2007
	IIaA17G1R1	3/21	
	IIaA18G1R1	1/21	
Nordirland	IIaA18G3R1	120/217 Proben	THOMPSON et al., 2007
	IIaA15G2R1	28/217	
	IIaA17G2R1	19/217	
	IIaA19G4R1	15/217	
	IIaA20G3R1	6/217	
	IIaA17G3R1, IIaA19G3R1	5/217	
	IIaA20G5R1	3/217	
	IIaA18G2R1, IIaA20G2R1	2/217	
IIaA16G3R1, IIaA17G1R1, IIaA18R1, IIaA19G2R1, IIaA20G4R1,	1/217		

2 Literaturübersicht

Tabelle 1 ff.

Nordirland	IlaA21G2R1	1/217	THOMPSON et al., 2007
Deutschland	IlaA15G2R1	43/53 Proben	BROGLIA et al., 2008
	IlaA14G2R1, IlaA17G2R1,	2/53	
	IlaA18G2R1	2/53	
	IlaA21G0R1, IlaA22G1R1, IlaA16G1R1	1/53	
Spanien	IlaA15G2R1	49/68 Betriebe	QUÍLEZ et al., 2008
	IlaA16G3R1	9/68	
	IlaA17G2R1	3/68	
	IlaA16G2R1, IlaA18G3R1	2/68	
	IlaA19G3R1	1/68	
Niederlande	IlaA15G2R1	89/129 Proben	WIELINGA et al., 2008
	IlaA17G1R1	14/129	
	IlaA16G3R1	6/129	
	IlaA13G2R1, IlaA14G2R1, IlaA17G2R1, IlaA18G4R1, IlaA18R1, IlaA19G2R1	2/129	
	IlaA11G2R1, IlaA12G2R1, IlaA16G1R1, IlaA16G2R1, IlaA18G3R1, IlaA19G1R1, IlaA21G3R1	1/129	
England	IlaA15G2R1	13/22 Betriebe	BROOK et al., 2009
	IlaA17G1R1	5/22	
	IlaA16G3R1	2/22	
	IlaA14G2R1 + IlaA19G1R1, IlaA15G2R1 + IlaA18G1R1	1/22	
Spanien	IlaA15G2R1	26/27 Proben	DÍAZ et al., 2010
	IlaA13G1R1	1/27	
Schweden	IlaA15G1R1, IlaA18G1R1, IlaA21G1R1	2/13	SILVERLÅS et al., 2010
	IlaA16G1R1	1/13	
Frankreich	IlaA15G2R1	38/51 Proben	FOLLET et al., 2011
	IlaA17G1R1	6/51	
	IlaA16G3R1	3/51	

2 Literaturübersicht

Tabelle 1 ff.

Frankreich	IaA16G2R1	2/51	FOLLET et al., 2011
	IaA13G1R1, IaA16G1R1	1/51	
Rumänien	IaA15G2R1, IaA16G1R1	2/6 Betriebe	IMRE et al., 2011
	IaA15G2R1 + IaA16G1R1	2/6	
Tschechische Republik	IaA15G2R1, IaA16G1R1	7/17 Betrieben	KVÁČ et al., 2011
	IaA15G1R1, IaA18G1R1, IaA22G2R1	1/17	
Schweden	IaA16G1R1, IaA13G2R1	1/2 Proben	SILVERLÅS und BLANCO- PENEDO, 2013
Frankreich	IaA15G2R1	47/52 Proben	RIEUX et al., 2013
	IaA16G3R1	5/52	
	IaA19G2R1	1/52	
Schweden	IaA16G1R1	26/81 Betriebe	SILVERLÅS et al., 2013
	IaA21G1R1	5/81	
	IaA15G2R1, IaA17G1R1c	4/81	
	IaA22G1R1	3/81	
	IaA17G1R1, IaA18G1R1c, IaA20G1R1	2/81	
	IaA13G1R1, IaA13G1R2, IaA14R1, IaA14G1R1b, IaA16G1R1b, IaA17R1, IaA18G1R1, IaA18G1R1d, IaA23G1R1	1/81	
	IaA21G1R1b + IaA16G1R1	1/81	
Frankreich	IaA15G2R1 + IaA18G1R1 (in demselben Betrieb mit zeitlichem Abstand detektiert)		RIEUX et al., 2014
England und Wales	IaA15G2R1	42/81 Proben	SMITH et al., 2014
	IaA17G1R1	13/81	
	IaA19G1R1, IaA18G3R1, IaA17G2R1, IaA13G2R1	4/81	
	IaA20G3R1, IaA18G1R1, IaA16G3R1, IaA15G2R2	2/81	
	IaA17G1R2, IaA15G2R0	1/81	
Polen	IaA17G1R1	21/71 Proben	siehe Seite 17
	IaA17G2R1, IaA15G2R1	14/71	

Tabelle 1 ff.

Polen	IaA16G1R1b	8/71	KAUPKE und RZEŽUTKA, 2015
	IaA10G1R1, IaA14G1R1, IaA16G3R1	2/71	
	IaA18G1R1c, IaA19G1R1	1/71	
Rumänien	IaA16G1R1	1/17 Proben	VIEIRA et al., 2015
Schweden	IaA16G1R1	2/7 Betriebe	BJÖRKMAN et al., 2015
Italien	IaA15G2R1	9/12 Betriebe	DÍAZ et al., 2018
	IaA16G3R1	1/12	
	IaA15G2R1 + IaA16G3R1	1/12	
Estland	IaA18G1R1	34/95 Proben	SANTORO et al., 2019
	IaA16G1R1	16/95	
	IaA20G1R1	9/95	
	IaA14G1R1	8/95	
	IaA16G2R1, IaA17G1R1, IaA21G1R1, IaA22G1R1	5/95	
	IaA19G1R1	3/95	

^a In die Gesamtzahl sind Proben/Betriebe mit eingeschlossen, in denen auch *C. parvum* einer anderen Subtypgruppe nachgewiesen wurde.

Die Sequenzierung des gesamten *C. parvum*-Genoms durch ABRAHAMSEN et al. (2004) ermöglichte in den vergangenen Jahren die Entwicklung von hochauflösenden Subtypisierungsmethoden, bei welchen gleichzeitig mehrerer Mikro- und Minisatelliten analysiert werden (XIAO und RYAN, 2008). Dies erlaubt die Differenzierung sogenannter *Multi locus genotypes* (MLG), die besser zur Charakterisierung der populationsgenetischen Struktur des Parasiten geeignet sind als die Untersuchung nur eines Genmarkers (WIDMER und SULLIVAN, 2012). Zu unterscheiden ist dabei zwischen der Untersuchung von Markern basierend auf der Länge des jeweiligen Genfragments (*Multilocus fragment typing*, MLFT) und der DNA-Sequenzanalyse der Genmarker (*Multilocus sequence typing*, MLST). Letztere wird als Goldstandard angesehen, weil damit eine größere Anzahl verschiedener Genotypen identifiziert werden kann, die insbesondere bei Mikrosatelliten unter 3 bp Länge im MLFT denselben Genotypen ergeben (ROBINSON und CHLAMERS, 2012). In vielen Studien wird jedoch MLFT angewendet: aus Kostengründen, wegen der einfacheren Anwendung und weil damit einer größeren Anzahl von Proben ein vollständiger Genotyp zugeordnet werden kann (DÍAZ et al., 2012). Die Identifikation immer neuer geeigneter Genmarker führte zur

Veröffentlichung von Studien, in denen bis zu 14 verschiedene Genfragmente in Kombination analysiert wurden und zur Generierung immer neuer MLGs (WIDMER und SULLIVAN, 2012). Ein einheitliches Tool mit definierten Mikro- und Minisatelliten gibt es bisher jedoch nicht, was eine Metaanalyse vorhandener Daten aus verschiedenen Studien nahezu unmöglich macht (ROBINSON und CHALMERS, 2012). In Europa arbeiten Spezialisten bereits an der Entwicklung eines standardisierten MLG-Schemas, um die Überwachung des zoonotischen Erregers *C. parvum* im Zuge des One-Health-Denkansatzes verbessern zu können (CHALMERS et al., 2018).

2.8 Viabilitäts- und Infektiositätsnachweis von *C. parvum*-Oozysten

Zum Viabilitätsnachweis werden Methoden verwendet, mit welchen man einschätzen kann, ob Oozysten lebensfähig sind. Rückschlüsse auf die Viabilität geben beispielsweise die Fähigkeit zur Exzystierung, die Intaktheit der Oozystenwand oder das Vorhandensein von Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) als Nachweis der metabolischen Aktivität. Jedoch kann mit diesen Methoden nicht festgelegt werden, ob der Parasit eine Infektion in einem Wirt hervorrufen kann (ROUSSEAU et al., 2018). Eine solche Aussage kann erst getroffen werden, wenn eine Inokulation des Parasiten in einen Wirtsorganismus erfolgt. Die dafür nötigen, kosten- und zeitintensiven Tierversuche ziehen jedoch immer ethische Bedenken nach sich, sodass die Evaluierung der Infektiosität von *C. parvum* häufig *in vitro* durch die Infektion von Zellkulturen vorgenommen wird (ROCHELLE et al., 2002; KEEGAN et al., 2003; ENTRALA et al., 2007; LEE et al., 2008; SHAHIDUZZAMAN et al., 2009; KING et al., 2012).

2.8.1 Bewertung der Viabilität

Lichtmikroskopisch sichtbare Veränderungen der Oozystenwand oder des Oozysteninhalts weisen bereits auf einen Verlust der Viabilität des Parasiten hin (ROUSSEAU et al., 2018). Um eine Infektion hervorrufen zu können, müssen die Sporozoiten in der Lage sein, die Oozystenhülle zu verlassen. Dieser Vorgang kann durch die Modulation der Kultivierungsbedingungen *in vitro* unterstützt werden (siehe auch 2.3.). Die Exzystierungsrate ist dabei zeit- und dosisabhängig und variiert je nach Exzystierungsprotokoll (KING et al., 2012; PECKOVÁ et al., 2016). In jedem Fall sind jedoch initial eine große Anzahl aufgereinigter, intakter Oozysten notwendig, welche nach In-vitro-Exzystierung der Anzahl an vollständig (leere Oozystenhülle) oder teilweise exzystierten Oozysten und der Anzahl frei gewordener Sporozoiten gegenübergestellt werden kann. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch

2 Literaturübersicht

Oozysten, die *in vitro* nicht exzystieren, im Mausmodell noch infektiös sind (NEUMANN et al., 2000; HOU et al., 2004).

CAMPBELL et al. (1992) schlugen die gleichzeitige Färbung von *C. parvum*-Oozysten mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und Propidiumiodid (PI) als exzellente Methode vor, um die Viabilität des Parasiten einschätzen zu können. Beide Farbstoffe lagern sich an die DNA an (CRISSMANN et al., 1973; WILSON et al., 1990). DAPI ist in der Lage intakte Membranen zu penetrieren, während PI nur nach Verlust der Membranintegrität an die Parasiten-DNA binden kann. Oozysten werden demnach als lebend betrachtet, wenn sie sich mit DAPI anfärben lassen, nicht aber mit PI (DAPI +, PI -; CAMPBELL et al., 1992).

In vielen Inaktivierungsstudien (BLACK et al., 1996; BUKHARI et al., 1999; 2000; QUÍLEZ et al., 2005; McGUIGAN et al., 2006) wurde sowohl die Exzystierungsrate als auch der Anteil lebender Oozysten (DAPI +, PI -) nach Behandlung mit verschiedenen Inaktivierungsmethoden ermittelt. Im Vergleich zur Infektiosität (Mausassay) stellte sich in diesen Studien heraus, dass Oozysten nach chemischer (BLACK et al., 1996; BUKHARI et al., 2000; QUÍLEZ et al., 2005) oder physikalischer Desinfektion (BUKHARI et al., 1999; McGUIGAN et al., 2006) nicht mehr infektiös für Mäuse sind, obwohl diese die Fähigkeit zur Freisetzung von Sporozoiten nicht ganz verloren hatten und mittels DNA-Färbung als lebend eingeschätzt wurden (BLACK et al., 1996; BUKHARI et al., 1999; 2000; QUÍLEZ et al., 2005; McGUIGAN et al., 2006). Durch beide In-vitro-Viabilitätsfärbungen kommt es folglich zur Unterschätzung der Effektivität von Inaktivierungsverfahren. Insbesondere die DAPI/PI-Färbung eignet sich allerdings durch die einfache und kostengünstige Durchführung, für die eine geringe Anzahl Oozysten nötig ist, für ein initiales Screening von Inaktivierungsmaßnahmen (ROUSSEAU et al., 2018).

Propidium-Monoazid (PMA) ist ein Farbstoff, der ebenfalls nur geschädigte Membranen penetrieren kann und unter Photoaktivierung einen stabilen Komplex mit der DNA bildet, sodass diese für eine Amplifikation in einer PCR nicht mehr zugänglich ist (NOCKER et al., 2007). Durch die Zugabe von PMA vor der DNA-Extraktion und der PCR spezifischer Kryptosporidien-Gene (*SSU rRNA*, *hsp70*) sind lebende und tote Oozysten differenzierbar (BRESCIA et al., 2009). Mit Detektion des *hsp70*-Gens ist gleichzeitig die Möglichkeit einer Artendifferenzierung möglich (BRESCIA et al., 2009). In Proben aus Oberflächenwasser und Abwasser wird die PMA-Bindung an die DNA jedoch bemerkenswert gehemmt (BRESCIA et al., 2009; LIANG und KEELEY, 2012). Im Gegensatz dazu stellten ALONSO et al. (2014) keine Beeinträchtigung des Assay fest, wenn die Viabilität von *C. parvum*-Oozysten in Abwasser untersucht wird. Die Autoren kombinierten die PMA-Behandlung mit der Amplifikation des *COWP*-Gens (ALONSO et al., 2004).

Weitere Viabilitätsassays basieren auf dem Nachweis von mRNA als Zeichen metabolischer Aktivität und damit Lebensfähigkeit, welche mittels einer Reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben wird (ROUSSEAU et al., 2018). *C. parvum*-Targets für die anschließende PCR sind beispielsweise *hsp70* (GARCÉS-SANCHEZ et al., 2013), *β-tubulin* (WIDMER et al., 1999), *amyloglyconidase* (JENKINS et al., 2000) und *CP2* (LEE et al., 2008). In einigen Studien korrelieren die Ergebnisse tendenziell mit der Infektiosität des Parasiten *in vivo* (WIDMER et al., 1999; JENKINS et al., 2000; ALUM et al., 2011) bzw. *in vitro* (BAJSZÁR und DEKONENKO, 2010). Andere Autoren dagegen beschreiben eine Diskrepanz zwischen der mRNA-Detektion und dem Vorhandensein infektiöser Parasiten (LEE et al., 2008; TRAVAILLÉ et al., 2016), da durch die Stabilität der RNA diese auch in bereits inaktivierten Oozysten noch nachweisbar ist (ROUSSEAU et al., 2018).

2. 8. 2 Bewertung der Infektiosität

In-vivo-Assays liefern zuverlässige Daten, um das Infektionsrisiko von Kryptosporidien einschätzen zu können (ROUSSEAU et al., 2018). Für *C. parvum* werden dazu vor allem neonatale Mäuse oder adulte Tiere verwendet, deren Immunsystem durch Medikamentengabe oder Knockout-Züchtung supprimiert ist. Die Fähigkeit zur Infektion kann *in vivo* durch die Untersuchung des Darmtrakts auf parasitäre Entwicklungsstadien (FINCH et al., 1993; CLANCY et al., 2000; JENKINS et al., 2000; BELOSEVIC et al., 2001; CLANCY et al., 2004; ROCHELLE et al., 2002) oder anhand der Oozystenausscheidung im Mäusekot nachgewiesen werden (HIKOSAKA et al., 2005; MORITA et al., 2002; TRAVAILLÉ et al., 2016). Bei letzterem Verfahren ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Abwesenheit von Oozysten im Kot nicht immer den tatsächlichen Infektionsstatus des Versuchstiers reflektiert (FINCH et al., 2001).

Häufig genutzte Mauslinien sind BALB/c-Mäuse (JENKINS et al., 2000; QUÍLEZ et al., 2005; LI et al., 2010, ASADPOUR et al., 2018), NMRI-Mäuse (DELAUNEY et al., 2000; LE GOFF et al., 2010), SCID-Mäuse (THEODOS et al., 1998; HIKOSAKA et al., 2005; GARVEY et al., 2010), CD-1-Mäuse (BLACK et al., 1996; NEUMANN et al., 2000; HOU et al., 2004; BISWAS et al., 2005; McGUIGAN et al., 2006), ICR-Mäuse (BLAGBURN et al., 1998; WIDMER et al., 1999; FUJINO et al., 2002) oder Kreuzungen dieser Linien (FINCH et al., 1993; BUKHARI et al., 2000; ROCHELLE et al., 2002).

In einigen Mausmodellen konnte die Verabreichung sehr geringer Mengen lebensfähiger Oozysten eine Infektion im Tier verursachen (DELAUNEY et al., 2000; YANG et al., 2000; BENAMROUZ et al., 2012), was für eine hohe Sensitivität des Bioassays spricht. Je nach

2 Literaturübersicht

Mauslinie, Alter zum Zeitpunkt der Infektion und Art der medikamentösen Immunsuppression sind die Tiere jedoch unterschiedlich stark empfänglich gegenüber *C. parvum* (KUHLS et al. 1992; RASMUSSEN und HEALEY 1992). Außerdem spielt auch das verwendete Erregerisolat für die Infektiosität eine Rolle (SAYED et al., 2016). Insbesondere für Inaktivierungsstudien ist zur Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse daher eine Standardisierung der Modelle von großer Bedeutung (KORICH et al., 2000).

Die hohe Sensitivität ist vor allem für die Untersuchung von potentiell kontaminierten Lebensmittelproben wichtig, da sich aus diesen eine Gewinnung gereinigter Oozysten, welche für Viabilitätstests nötig sind (siehe 2.7.1.), oft als schwierig erweist. Dem gegenüber stehen die ethischen Bedenken, die bei jedem Tierversuch zu berücksichtigen sind, die hohen Kosten und die komplexe und langwierige Versuchsdurchführung (ROUSSEAU et al., 2018).

Diese Nachteile versucht man durch die Etablierung von Zellkulturexperimenten zur Evaluation der Infektiosität von *C. parvum in vitro* zu umgehen. Nach Infektion mit *C. parvum*-Oozysten oder -Sporozoitien (nach In-vitro-Exzystierung) wird der Zellmonolayer gewaschen, sodass nur infektiöse Entwicklungsstadien, die bereits in Kontakt mit der Wirtszelle stehen, auf der Zellkulturplatte verbleiben. Diese Stadien sind durch den Nachweis von mRNA bzw. DNA detektierbar (ROCHELLE et al., 1997; JOACHIM et al., 2003a) und können mithilfe einer Standardkurve auch quantifiziert werden (KEEGAN et al., 2003; SHAHIDUZZAMAN et al., 2009). In anderen Studien wird der infizierte Monolayer mit Antikörpern (Ak) gefärbt, sodass Infektionsherde unter dem Mikroskop sichtbar sind und ausgezählt werden können (SLIFKO et al., 1999; POKORNY et al., 2002; ENTRALA et al., 2007). Sowohl mit Reverse-Transkriptase-PCR nach Infektion von Caco-2-Zellen (ROCHELLE et al., 1997) als auch mit der Auszählung von Infektionsherden in HCT-8-Zellen (SLIFKO et al., 1999) konnten sehr geringe Mengen infektiöser *C. parvum*-Oozysten nachgewiesen werden. Die Anzahl an Infektionsherden korreliert dabei signifikant mit der initialen Infektionsdosis (JOACHIM et al., 2003a).

JOHNSON et al. (2012) stellten fest, dass die Kombination aus Zellkultur (HCT-8) und PCR gegenüber Real-Time-PCR und Ak-Färbung eine hohe Rate an falsch-positiven Ergebnissen produziert, weil damit auch DNA aus inaktivierten Oozysten nachgewiesen wird. Für die Autoren war die fluoreszenzbasierte Sichtbarmachung der Infektionsherde am besten geeignet, um die Infektiosität des Erregers, insbesondere in der Wasseraufbereitung, einfach evaluieren zu können (JOHNSON et al., 2012). In einer Studie zur Inaktivierung von *C. parvum*-Oozysten nach Chlor- und UV-Behandlung korrelierten die Ergebnisse aus der Zellkultur (HCT-8) in Verbindung mit der Ak-Färbung signifikant mit den Inaktivierungsraten des Bioassays mit neonatalen BALB/c-Mäusen (SLIFKO et al., 2002). Dagegen verursachten bei -20 °C gelagerte Oozysten keine Infektionsherde in bovinen Zellen des Eileiters (BFTE-Zellen), waren jedoch infektiös für medikamentös immunsupprimierte Mäuse (KIM und HEALEY, 2001).

Eine gute Übereinstimmung stellten ROCHELLE et al. (2002) bei der Gegenüberstellung der Zellkultur mit anschließender Reverse-Transkriptase-PCR und dem Mausmodell fest. HCT-8-Zellen waren in dieser Studie im Vergleich zu Caco-2- und MDCK-Zellen besser geeignet, die Infektiosität in CD-1/ICR-Mäusen zu evaluieren (ROCHELLE et al., 2002). Diese Aussage wurde durch JENKINS et al. (2003) unter Verwendung von BALB/c-Mäusen bei der Evaluation der Infektiosität nach unterschiedlich langer Lagerungszeit der Oozysten bestätigt. GARVEY et al. (2010) führten den Bioassay mit SCID-Mäusen durch und kamen mittels quantitativer PCR nach Infektion von HCT-8-Zellen ebenfalls zu übereinstimmenden Ergebnissen.

2.9 Inaktivierung des Parasiten

In der Umwelt liegen Kryptosporidien als ca. 5 µm große infektiöse Oozysten vor. Die Oozystenwand setzt sich aus einer äußeren polysaccharidhaltigen Matrix (Glykokalyx), einer Lipid- und einer inneren Proteinschicht zusammen (JENKINS et al., 2010). Letztere besteht zum Großteil aus dem cysteinreichen Protein COWP 1 (SPANO et al., 1997). Dadurch ist die Oozyste als exogenes Dauerstadium sehr widerstandsfähig gegen chemische und physikalische Umwelteinflüsse. Da Wasser als Inhaltsstoff, Transportmedium und Reinigungsmittel in der Lebensmittelproduktion eine wichtige Rolle spielt (KIRBY et al., 2003), ist die Resistenz von Kryptosporidien-Oozysten gegenüber üblichen, in der Wasseraufbereitung verwendeten Chlorkonzentrationen (KORICH et al., 1990) und die Entwicklung neuer Verfahren zur Inaktivierung des Erregers im Gesundheitswesen von zentraler Bedeutung.

2.9.1 Physikalische Inaktivierung

2.9.1.1 Temperatur

Nach der Aufnahme des Parasiten hat die Körpertemperatur im Wirt bedeutenden Einfluss auf die Freisetzung von Sporozoiten aus der umweltrobusten Kryptosporidien-Oozyste (FAYER und LEEK, 1984). Durch ungleiche Versuchsdesigns kamen verschiedene Autoren zu recht unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich des Effektes von Temperatur auf *Cryptosporidium*-Oozysten. ANDERSON (1985) konnte nach der Untersuchung von Darmabstrichen infizierter Mäuse eine Inaktivierung der Oozysten feststellen, wenn diese vorher über 3 min auf 55 °C erhitzt wurden. FAYER (1994) fand keine endogenen Stadien des Parasiten im Darm von Mäusen, die mit *C. parvum*-Oozysten infiziert wurden, welche zuvor bei mindestens 72,4 °C über 1 min bzw. bei mindestens 64,2 °C über 5 min inkubiert wurden. FUJINO et al. (2002) detektierten keine Oozysten im Mäusekot, wenn das Inokulum vor Infektion über 5 s bei 70 °C,

2 Literaturübersicht

über 15 s bei 60 °C oder über 30 s bei 55 °C erhitzt wurde. Durch Erhitzung von Oozysten auf mindestens 56 °C über 20 min konnten SHAHIDUZZAMAN et al. (2010) eine vollständige Inaktivierung von *C. parvum* erreichen. In dieser Studie erfolgte die Evaluierung der Infektiosität *in vitro* mit einer Kombination aus Zellkultur und quantitativer PCR.

Nachdem ein kontaminiertes Lebensmittel als Infektionsquelle eines großen Kryptosporidiose-Ausbruch identifiziert werden konnte (MILLARD et al., 1994), wurde die Effektivität der Pasteurisierung gegenüber Kryptosporidien-Oozysten in Milch (HARP et al. 1996) und Apfelsaft (DENG und CLIVER, 2001) untersucht. Sowohl im Maus-Assay (HARP et al. 1996) als auch durch Evaluierung der Infektiosität in der Zellkultur durch Ak-Färbung (DENG und CLIVER, 2001) konnte nachgewiesen werden, dass die Erhitzung dieser Lebensmittel auf 71,7 °C über 10 s zur Inaktivierung des Erregers führt. Bei Inaktivierungsstudien *in vitro* dienen häufig bei 70 °C inkubierte Oozysten als hitzeinaktivierte Kontrolle (ROCHELLE et al., 2002; JOACHIM et al., 2003a; NAJDROWSKI et al., 2007; DELLING et al. 2017).

In den meisten Studien wurde der Effekt einer prompten Erhitzung auf Oozysten unter Laborbedingungen untersucht (ERICKSON und ORTEGA, 2006). Im Gegensatz dazu ermittelten LI et al. (2005; 2010) die Inaktivierungsrate von *C. parvum*-Oozysten, die auf einer Kotmatrix natürlich vorkommenden Temperaturschwankungen in Kalifornien ausgesetzt waren. In den Sommermonaten war der Parasit innerhalb eines 24-Stunden-Zyklus nicht mehr infektiös für Mäuse (LI et al., 2005). Dagegen blieben über die Hälfte der Oozysten im Winter bei einem Temperaturzyklus mit maximal 17,3 °C noch 90 Tage infektiös (LI et al., 2010). Auch ROBERTSON und GJERDE (2004) konnten mittels DAPI/PI-Färbung erst nach 75 Tagen einen deutlichen Abfall lebenden Oozysten feststellen, die den Umweltbedingungen des norwegischen Winters auf einer Kotmatrix ausgesetzt waren. Die Autoren vermuteten, dass wiederholte Frost-Tau-Zyklen einen negativen Einfluss auf die Viabilität des Erregers haben. KATO et al. (2002) fanden im Gegensatz dazu heraus, dass Oozysten länger potentiell infektiös bleiben, wenn Tauprozesse zwischengeschaltet sind, als bei permanentem Gefrieren. Eine 99 %ige Inaktivierung wurde nach 47 Tagen bei -10 °C in Wasser erreicht (KATO et al., 2002). Bei niedrigeren Temperaturen erfolgt die Inaktivierung schneller. Bei -15 °C, -20 °C bzw. -70 °C ist der Parasit nach 168 h, 24 h bzw. einer Stunde nicht mehr infektiös für Mäuse (FAYER und NERAD, 1996). Nach siebentägigem Einfrieren von Oozysten bei -20 °C sind in der Zellkultur keine Infektionsherde zu sehen (POKORNY et al., 2002). KIM und HEALEY (2001) kamen zu dem Ergebnis, dass der Erreger bei dieser Temperatur bereits nach zwei Tagen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Maus-Assay) seine Infektionsfähigkeit vollständig verliert. Schnelles Gefrieren mittels flüssigem Stickstoff führt ebenfalls zur Abtötung von *C. parvum* (ROBERTSON et al., 1992).

2.9.1.2 UV-Bestrahlung

Ultraviolettes (UV) Licht, insbesondere UV-C-Strahlung, findet in Routine-Entkeimungssystemen von Laboren Anwendung. Bei der Bestrahlung führt die Absorption von Photonen durch die DNA eines Organismus zur Störung der Reproduktionsfähigkeit und zur Inaktivierung des Erregers (ERICKSON und ORTEGA, 2006). Obwohl DNA-Reparatur-Gene im Kryptosporidien-Genom vorhanden sind (ROCHELLE et al., 2004), wurde eine Reaktivierung nach UV-Bestrahlung bisher noch nicht berichtet (BELOSEVIC et al., 2001; SHIN et al., 2001; ZIMMER et al., 2003). Ultraviolettes Licht gilt daher als hoch effektiv zur Inaktivierung von *C. parvum*-Oozysten, wobei UV-C-Strahlen bei einer Wellenlänge zwischen 250 nm und 270 nm den größten Effekt auf die Infektionsfähigkeit von *C. parvum*-Oozysten haben (LINDEN et al., 2001). Bei der zusätzlichen Verwendung eines Photokatalysators, wie z. B. Titanoxid, wird die Inaktivierung noch verstärkt (RYU et al., 2008).

Zu Desinfektionszwecken werden häufig Quecksilberdampflampen als künstliche UV-C-Strahlungsquelle eingesetzt, die unter Niedrig- oder Mitteldruck Strahlung der Wellenlänge 254 nm emittieren. In der Wasseraufbereitung müssen die verwendeten UV-Geräte bezogen auf diese Wellenlänge eine Strahlungsleistung von mindestens 400 J/m² (40 mJ/cm²) aufweisen (DVGW, 2012). Bei dieser Leistung kann eine 99,99 %ige (4 log₁₀) Inaktivierung vieler Pathogene im Wasser erreicht werden (ENTRALA et al., 2007). Dabei ist der Inaktivierungserfolg jedoch exponentiell abhängig von der UV-Dosis (MORITA et al., 2002), welche mit längerer Bestrahlungsdauer und/oder geringerem Abstand zur Strahlungsquelle zunimmt. Tabelle 2 zeigt die in verschiedenen Studien getesteten UV-Dosen in Zusammenhang mit deren Inaktivierungserfolg und dem dabei genutzten Assay zur Evaluierung der Infektionsfähigkeit.

Tabelle 2: Inaktivierung von *C. parvum* nach UV-Bestrahlung mit verschiedenen Dosen

UV-Dosis (mJ/cm ²)	Log-Reduktion (log ₁₀)	genutzter Assay	Literatur
in der Wasseraufbereitung		Maus-Assay (Untersuchung des terminalen Ileums)	BUKHARI et al., 1999
19	3,9		
66; 159	> 4,5		
im Labor			
41; 82; 246	> 4,5		
123	3,9	Maus-Assay (Untersuchung des terminalen Ileums)	CLANCY et al., 2000
<i>medium-pressure UV collimated beams</i>			
3; 6; 9	> 1,8		
1; 20	> 2,8		

2 Literaturübersicht

Tabelle 2 ff.

<i>low-pressure UV collimated beams</i>		Maus-Assay	CLANCY et al., 2000
3; 6 ; 9	> 2,0	(Untersuchung des terminalen Ileums)	
8; 16; 33	> 2,8		
10	≥ 2,3	Maus-Assay	BELOSEVIC et al., 2001
60	≥ 4,0	(Darmtrakt gelabelt, Durchflusszytometrie)	
240	≥ 4,5		
0,48	1	Maus-Assay	MORITA et al., 2002
0,97	2	(Kot mit Immunfluoreszenz untersucht)	
1,92	4		
3; 6; 12	> 1,5	Zellkultur und Real-Time-PCR	KEEGAN et al., 2003
20; 30	2,2		
500, 1000	> 3,8		
2	3,2 (<i>Iowa strain</i>)	Maus-Assay	CLANCY et al., 2004
4	4,1 (<i>Iowa strain</i>)	(Untersuchung des terminalen Ileums)	
7,5	3 (<i>Iowa strain</i>)	Zellkultur und Reverse-Transkriptase-PCR	ROCHELLE et al., 2004
5,6	2 (Mittelwert aus allen getesteten Stämmen)	Maus-Assay (Untersuchung des terminalen Ileums)	
<i>medium-pressure UV</i>		Zellkultur und Auszählung Infektionsherde	ENTRALA et al., 2007
40	4,9		
<i>low-pressure UV</i>			
40	4,8		
15	> 2	Zellkultur und	LEE et al., 2008
23	> 3	Reverse-	
278	> 6	Transkriptase-PCR	

BUKHARI et al. (1999) verglichen die Wirkung einer Niedrigdruck-UV-Lampe unter Laborbedingungen mit einem UV-Reaktor (beinhaltet sechs Niedrigdruck-UV-Lampen), der zur Wasseraufbereitung genutzt wird, und kamen zu fast übereinstimmenden Ergebnissen. ENTRALA et al. (2007) zeigten im Vergleich zwischen Mittel- und Niedrigdrucklampen bei

derselben UV-Dosis nahezu identische Inaktivierungsraten. Zu diesem Ergebnis kamen auch CLANCY et al. (2000). Waren die Oozysten in Wasser mit höherem Trübungsgrad suspendiert, erzielte bereits die geringste UV-Dosis (3 mJ/cm^2) eine Reduktion von $> 2,6$ Log-Stufen (CLANCY et al., 2000). Im Gegensatz dazu fanden KING et al. (2008) heraus, dass zur Inaktivierung von Oozysten in Wasser mit hohem Verschmutzungsgrad eine höhere UV-Dosis nötig ist. Auch der im Experiment verwendete Kryptosporidien-Stamm (CLANCY et al., 2004; ROCHELLE et al., 2004) und die Lagerungsdauer der Oozysten (ENTRALA et al., 2007) haben Einfluss auf die Effektivität der UV-Bestrahlung.

Durch die Absorption der Erdatmosphäre gelangt vor allem UV-A-Strahlung und in einem geringem Ausmaß UV-B-Strahlung von der Sonne auf die Erdoberfläche (HALLIDAY et al., 2011). CONELLY et al. (2007) konnten den negativen Effekt natürlicher UV-Strahlung auf Kryptosporidien-Oozysten besonders im Sommer mit einer Reduktion der Infektiosität im Zellkultur-Assay (Auszählung der Infektionsherde) nachweisen. Vergleichbare Ergebnisse wurden durch KING et al. (2008) veröffentlicht. In dieser Studie fand ein Zellkultur-Modell mit anschließender Real-Time-PCR Anwendung. Der inaktivierende Effekt ging nach Einsatz eines UV-A-Filters für 379 nm bzw. 400 nm Wellenlänge jedoch verloren (KING et al., 2008). Auch SOLIMAN et al. (2018) konnten zeigen, dass UV-C-Bestrahlung aus einer künstlichen Quelle Oozysten effektiver inaktiviert als natürliche Sonneneinstrahlung.

2.9.1.3 Gammastrahlung

Gammastrahlung ist aufgrund ihrer kinetischen Energie in der Lage, Elektronen aus einem Atom oder Molekül herauszulösen. Vor allem Hydroxylradikale, die aus dem Umgebungswasser entstehen, führen in einem Organismus zur Schädigung der DNA nach der Exposition gegenüber ionisierenden Strahlen (ALLAL et al., 2004). Eine dosisabhängige DNA-Schädigung wurde auch bei *C. parvum* nach Bestrahlung der Oozysten mit 1 - 25 kGy beschrieben (LEE et al., 2010). Morphologische Veränderungen bestrahlter Sporozysten sind mikroskopisch zumeist ab einer Dosis von 10 kGy sichtbar, wobei die Oozystenwand jedoch auch bei 25 kGy keine Alteration aufweist (JOUNG et al., 2011). Mit 25 kGy bestrahlte Oozysten sind noch zu 43 % infektiös für immunsupprimierte Mäuse und eine vollständige Reduktion der Infektiosität wird erst mit 50 kGy erreicht (YU und PARK, 2003). Bei Anwendung eines Zellkultur-Modells und anschließender Real-Time-PCR konnten 99,9 % der Oozysten ($3 \log_{10}$) mit 25 kGy inaktiviert werden, wenn diese nach Bestrahlung sieben Tage gelagert wurden (LEE et al., 2009). Durch Untersuchung des Kryptosporidien-Proteoms konnten LEE et al. (2011) nach Gammabestrahlung die gesteigerte Expression zweier Proteine

herausstellen, welche antioxidative Eigenschaften haben. *C. parvum* gilt daher im Vergleich zu *C. muris* (YOON und YU, 2011) und anderen protozoären Parasiten (SINGH und GILL et al., 1975; DUBEY et al., 1996) als besonders resistent gegenüber Gammastrahlen.

2.9.1.4 Ultraschall

Die desinfizierende Wirkung von Ultraschall wird durch die Ausbildung von Kavitationen hervorgerufen, welche sowohl physikalisch (Scherkräfte, hoher Druck) als auch chemisch (freie Radikale) zur Inaktivierung von Zellen führen (ABELEDOLAMEIRO et al., 2018). ASHOKKUMAR et al. (2003) vermuteten, dass bei der Ultraschallbehandlung die Oozystenwand von in Wasser suspendierten Kryptosporidien durch Scherkräfte beschädigt wird. Die Autoren führten die Behandlung mit einer Frequenz von 20 kHz bei 1,5 W über 30 min und bei 2,5 W über 15 min durch und stellten bei beiden Modi mittels DAPI/PI-Färbung eine Inaktivierung von über 90 % der Oozysten fest. Mit derselben Evaluationsmethode konnten OLVERA et al. (2008) unter Anwendung von 4,1 W und 1 MHz nach 4 min ähnliche Inaktivierungsraten erzielen. ABELEDOLAMEIRO et al. (2018) fanden bei 20 kHz, 80 W und 30 min Expositionszeit mit dieser Färbemethode keine lebenden Oozysten mehr. Im Maus-Assay waren nach 60 s bei 52 W und 27,5 kHz Ultraschallbehandlung *C. parvum*-Oozysten noch für 94,5 % der Tiere infektiös (OYANE et al., 2005). Eine 30 min Exposition bei 300 W und 22,6 kHz führte in derselben Studie zu einer Reduktion der Infektiosität von > 99,93 %.

2.9.1.5 Sonstige Methoden der physikalischen Inaktivierung

Unbehandelte Nahrungsmittel, wie z. B. rohes Gemüse (ROBERTSON und GJERDE 2001; RAI et al., 2008), Meerestiere (FAYER et al., 1998b; GRACZYK et al. 2000), aber auch frisch gepresster Saft (MILLARD et al., 1994) gelten als potentielle Infektionsquelle für lebensmittelassoziierte Kryptosporidiose. Bei diesen Speisen und Getränken würde eine zu hohe Erhitzung zu einem Qualitätsverlust führen, sodass andere sanftere Inaktivierungsverfahren erforderlich sind.

Die Behandlung mit hohem hydrostatischem Druck ist eine solche Methode. Sie wurde von SLIFKO et al. (2000) hinsichtlich der Inaktivierung von *C. parvum*-Oozysten in Apfel- und Orangensaft getestet. Nach 30 s Behandlung von Oozysten mit 550 MPa waren in der anschließend inokulierten Zellkultur keine Anzeichen einer Infektion zu sehen. COLLINS et al.

(2005b) untersuchten experimentell infizierte Austern und fanden heraus, dass das Muschelfleisch nach Druckbehandlung von 550 kPa über 180 s noch bei 6,7 % (2/30) der damit gefütterten Mäuse eine Infektion hervorrief. Außerdem nahm die Inaktivierungsrate bei längeren Expositionszeiten (bis 360 s) sogar wieder ab (COLLINS et al., 2005b).

Auch Mikrowellenstrahlung (2100 W, 3 s) ruft keine effektive Herabsetzung der Infektiosität von *C. parvum* gegenüber Mäusen hervor, ohne dass bei hohem Energieeintrag aufgrund der Temperatur qualitätsmindernde Effekte auf empfindliche Lebensmittel auftreten, wie es für experimentell infizierte Austern gezeigt wurde (COLLINS et al. 2005a). Nach der Erhitzung von Paprika in der Mikrowelle (850 W, 5 min), auf deren Oberfläche *C. parvum* gegeben wurde, fanden DUHAIN et al. (2012) mittels Nukleinsäurefärbung noch ca. 6 % lebende Oozysten. ORTEGA und LIAO (2006) kamen mit dieser Evaluierungsmethode bei viel kürzeren Expositionszeiten zu ähnlichen Ergebnissen, führten jedoch einen Maus-Assay durch. Bei direkter Bestrahlung der Oozysten mit Mikrowellen von 650 W über mindestens 30 s, von 700 W über mindestens 45 s bzw. von 1100 W über mindestens 20 s konnten die Autoren keine Entwicklungsstadien von *C. parvum* im terminalen Ileum von Mäusen mehr finden, die mit solchen Oozysten inokuliert wurden (ORTEGA und LIAO, 2006).

2.9.2 Chemische Inaktivierung

Die chemische Desinfektion findet sowohl in der Trinkwasseraufbereitung, als auch im medizinischen Bereich und in Laboren zur Eliminierung von Mikroorganismen auf Oberflächen und in Geräten Anwendung.

Um eine Aussage über die Effektivität verschiedener Chemikalien zur Inaktivierung von Kryptosporidien zu treffen, wurden im Labor verschiedene Einwirkzeiten und Konzentrationen diverser Substanzen getestet. Besonders bei sehr reaktiven oder flüchtigen Substanzen, wie Chlor (PEETERS et al., 1989) oder Ozon (FINCH et al., 2001) ist zu berücksichtigen, dass die Ausgangskonzentration der wirksamen Substanzen in der Lösung durch chemische Reaktionen während des Experiments abnimmt. Die Beziehung zwischen der Konzentration (C) und der Kontaktzeit (t) wird allgemein als Ct -Konzept bezeichnet. In Studien zur Inaktivierung von Kryptosporidien wurden jedoch oft verschiedene mathematische Modelle zur Berechnung von Ct -Werten verwendet, was einen Vergleich schwierig macht (GYÜREK et al., 1999; FINCH et al., 2001).

2.9.2.1 Chlorverbindungen

In der Wasseraufbereitung sind zur chemischen Desinfektion am häufigsten Chlorverbindungen in Gebrauch (ERICKSON und ORTEGA, 2006). Wirksam gegen Mikroorganismen ist dabei freies Chlor, welches als hypochlorige Säure (HOCl) oder als dessen Salz (OCl⁻) vorliegt. Letzteres findet z. B. in Form von NaOCl Anwendung.

Gegenüber Kryptosporidien ist diese Art der Desinfektion jedoch ineffektiv. Durch die Behandlung mit 0,43 mg/l Chlordioxid über 30 min (Endkonzentration 0,22 mg/l) wird die Infektiosität von *C. parvum* nicht vollständig eliminiert (PEETERS et al., 1989). KORICH et al. (1990) infizierten Mäuse mit 600, 6000 oder 60.000 Oozysten und konnten bei der mittleren und der hohen Infektionsdosis auch nach einstündiger Behandlung der Oozysten mit Chlordioxid (1,3 ppm), Chlor (80 ppm) oder Monochloramin (80 ppm) Parasitenstadien im Darm der Tiere feststellen. Oozysten, die bis zu zwei Stunden mit 5,25 % NaOCl behandelt wurden, waren bei einer Infektionsdosis von 150.000 Oozysten/Tier noch infektiös für BALB/c-Mäuse (FAYER, 1995). Auch nach Inkubation von Oozysten mit 5 mg/l freiem Chlor über 24 h kommt es zu keinerlei Reduktion der Infektiosität in dieser Mauslinie (VENZCEL et al., 1997).

Basierend auf einem In-vitro-Modell mit MDCK-Zellen errechneten MURPHY et al. (2014) für eine Inaktivierung von drei Log-Stufen bei 21 mg/l freiem Chlor eine benötigte Einwirkzeit von 455 min. Durch die Verwendung von 5 mg/l Chlordioxid und die zusätzliche Zugabe von 2,6 mg/l freiem Chlor konnte diese auf weniger als ein Viertel der Zeit verkürzt werden (MURPHY et al., 2014). Bei der Infektion von HCT-8-Zellen mit Oozysten nach 33 min Behandlung mit 6 % NaOCl konnten WEIR et al. (2002) keine signifikante Abnahme der Anzahl an Infektionsherden feststellen. KEEGAN et al. (2003) testeten Konzentrationen von 2 mg/l, 5 mg/l und 10 mg/l Chlor und Behandlungszeiten von bis zu 24 h und bestätigten die Resistenz von *C. parvum* in allen Experimenten mittels Zellkultur und Real-Time-PCR.

KEEGAN et al. (2003) testeten diese Konzentrationen auch für Oxidantien, welche aus der Elektrolyse von salzhaltigem Wasser entstehen (sogenannte *mixed oxidants*, MIOX) und kamen zu demselben Ergebnis wie für Chlor. BAJSZÁR und DEKONENKO (2009) berichteten dagegen von einer vollständigen Inaktivierung der Oozysten, wenn diese 4 h mit MIOX (125 mg/l) inkubiert wurden. Eine Inaktivierung um ca. drei Log-Stufen erreichten auch VENCZEL et al. (1997) in einer Testung *in vivo* (BALB/c-Mäuse) mit 5 mg/l MIOX und CASTEEL et al. (2000) *in vitro* (MDCK-Zellen) mit 4 mg/l MIOX bei jeweils 4 h Einwirkzeit. Im Gegensatz dazu konnten VENCZEL et al. (2004) nach 90 min Behandlung der Oozysten mit 5mg/l MIOX keine nennenswerte Reduktion der In-vitro-Infektiosität (MDCK-Zellen) feststellen. Am Ende der Inkubationszeit wurde dabei eine MIOX-Konzentration von 3,2 mg/l ermittelt.

2.9.2.2 Ozon

Ozon stellt eine effektive Alternative zu den gegenüber Kryptosporidien unwirksamen Chlorverbindungen dar und wird in der Wasseraufbereitung in Kombination mit der Chlorbehandlung verwendet. Unter Laborbedingungen konnte durch eine initiale Ozonbehandlung die Effektivität von Monochloramin um den Faktor 8,5 gesteigert werden (RENNECKER et al., 2001).

Bei einer Ausgangskonzentration von 2,25 mg/l (Endkonzentration 1,8 mg/l) und einer Einwirkzeit von 8 min kann die Infektiosität von *C. parvum* für Swiss-OF1-Mäusen um über 99 % gehemmt werden (PEETERS et al., 1989). Bei höheren Infektionsdosen und geringeren Ozonkonzentrationen (initial 0,59 - 1,06 mg/l, Endkonzentration 0,24 - 0,51 mg/l) wurden teilweise jedoch nur Inaktivierungsraten von 95 % erreicht (PEETERS et al., 1989). In BALB/c-Mäusen konnten KORICH et al. (1990) keine Entwicklungsstadien des Parasiten nachweisen, wenn die Oozysten über 10 min mit 1 ppm Ozon behandelt wurden. Vergleichbare Ergebnisse erlangten OWENS et al. (2000) nach Anwendung von Ak-Markierungen des Darmgewebes derselben Mauslinie. Die Autoren versetzten gefiltertes Flusswasser mit verschiedenen Mikroorganismen einschließlich Kryptosporidien und ermittelten für eine Inaktivierung von zwei Log-Stufen einen benötigten *Ct*-Wert von ca. 6 mg*min/l.

RENNECKER et al. (2001) und CORONA-VASQUEZ et al. (2002) evaluierten die Viabilität von behandelten *C. parvum*-Oozysten anhand eines In-vitro-Exzystierungsprotokolls und berechneten für eine Inaktivierung um zwei Log-Stufen einen *Ct* -Wert von 4,5 mg*min/l (RENNECKER et al., 2001) bzw. 6 mg*min/l Ozon (CORONA-VASQUEZ et al., 2002). In beiden Studien wurden Unterschiede zwischen verschiedenen Chargen desselben *C. parvum*-Stammes und ein negativer Einfluss der Lagerungsdauer auf die Viabilität der Oozysten nach Behandlung festgestellt.

Auch eine Erniedrigung der Temperatur hat negativen Einfluss auf den Inaktivierungserfolg von Ozon (FINCH et al., 2001; LI et al., 2001; CORONA-VASQUEZ et al., 2002). Im Gegensatz dazu wurden unter Laborbedingungen bei Werten zwischen pH 6 und pH 10 keine signifikanten Unterschiede festgestellt (RENNECKER et al., 2001), obwohl gelöstes Ozon mit steigendem pH instabiler wird und in bromidhaltigem Wasser (Meereswasser, Brackwasser, Poolwasser) das Reaktionsprodukt Bromat erzeugt (HOIGNÉ et al., 1988). Diese kanzerogene Verbindung ist im Zuge der Trinkwasseraufbereitung mit Ozon schwer zu eliminieren (ERICKSON und ORTEGA et al., 2006).

2.9.2.3 Alkohole und Aldehyde

Zur Oberflächendesinfektion im Labor wird üblicherweise 70 %iges Ethanol verwendet, welches zur Inaktivierung von *C. parvum* nach 10 min Einwirkzeit jedoch nicht geeignet ist (BARBEE et al., 1999). WEIR et al. (2002) überprüften die Wirksamkeit neun verschiedener Substanzen gegenüber *C. parvum*-Oozysten, darunter 70 % Ethanol, 70 % Isopropanol und 37 % Methanol. Letzteres führte zu einer signifikanten Reduktion von Infektionsherden in HCT-8-Zellen. Keiner der getesteten Alkohole konnte den Parasiten jedoch komplett inaktivieren (WEIR et al., 2002). Auch durch die Behandlung mit geringeren Ethanolkonzentrationen (9 % und 40 %) über acht Tage wird *C. hominis* zwar zu 66 % bzw. zu 72 % inaktiviert, in MRC-5-Zellen sind Entwicklungsstadien dieser Kryptosporidien-Spezies dennoch nachweisbar (DAWSON et al., 2004). Im Zuge der Etablierung eines Membranfilter-Protokolls zur Gewinnung von *C. parvum*-Oozysten aus Wasserproben untersuchten CARRENO et al. (2001) den Einfluss eines vier minütigen Zentrifugationsschrittes während der Exposition zu 95 % und 70 % Ethanol. Dadurch wurde die Infektiosität der Oozysten für HCT-8-Zellen auf die Hälfte reduziert.

Durch die Oxidation von primären Alkoholen entstehen Aldehyde. Gegenüber *C. parvum* führt eine mit Formaldehyd gesättigte Atmosphäre nach 24 h Exposition zwar zur Reduktion, aber nicht zur Elimination der Infektiosität in BALB/c-Mäusen (FAYER et al., 1996). Auch Glutaraldehyd führte in einer Konzentration von 2,5 % erst nach 10 h Inkubation zum Erlöschen der Infektiosität von *C. parvum*-Oozysten für Caco-2-Zellen (WILSON und MARGOLIN, 1999) und HCT-8-Zellen (WILSON und MARGOLIN, 2003). Unter Anwendung derselben Parameter konnten die Autoren bei höheren Infektionsdosen ($> 1,5 \cdot 10^6$ Oozysten) bzw. unter Zugabe von FKS zur Simulation eines Proteinfehlers jedoch Entwicklungsstadien des Parasiten detektieren (WILSON und MARGOLIN, 1999; 2003).

2.9.2.4 Ammoniumverbindungen

C. parvum-Oozysten, die 24 h einer mit Ammoniak (NH_3) gesättigten Atmosphäre ausgesetzt waren, verursachten in intestinalen Epithelzellen von BALB/c-Mäusen keine Infektion (FAYER et al., 1996). Basierend auf Viabilitätstests (Exzystierung und DAPI/PI-Färbung) sahen JENKINS et al. (1998) eine Einwirkzeit von 24 h bei einer NH_3 -Konzentration von 3,9 M als ausreichend an, die Viabilität von Oozysten um fünf Log-Stufen (99,999 %) zu reduzieren. Die Autoren konnten eine steigende Inaktivierung bei steigender NH_3 -Konzentration (0,007 M bis 0,148 M) und zunehmender Expositionszeit (10 min, 1 h, 24 h) feststellen, welche unabhängig

vom pH-Wert war. Es wurde vermutet, dass die chemische Aktivität des freien NH_3 und seine Fähigkeit, in die Oozystenwand bzw. Sporozoitenmembran einzudringen, zur Inaktivierung führen (JENKINS et al., 1998). Mit den gleichen In-vitro-Assays wurde dieser Zusammenhang auch von REINOSO et al. (2008) festgestellt. Nach vier Tagen bei initial 50 mg/l NH_3 (Endkonzentration ca. 35 mg/l) war der Anteil lebender Oozysten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um ca. 55 % geringer und nahm im Vergleich zum Startzeitpunkt des Experiments um ca. 76 % ab (REINOSO et al., 2008). Basierend auf dem Nachweis von *C. parvum*-mRNA erreichten LIANG und KEELEY (2012) nach einer Stunde Inkubation bei einer NH_3 -Konzentration von 0,75 M eine Reduktion lebender Oozysten auf 0,1 % des Ausgangswertes.

WEIR et al. (2002) wendeten ein hauseigenes Desinfektionsmittel aus 2,5 % Ammoniumhydroxid (ca. 0,2 M) und Frontscheibenreiniger an, womit nach 13 min und nach 33 min Inkubation der Oozysten Infektionsherde in HCT-8-Zellen signifikant reduziert wurden. Auf den möglichen Einfluss anderer chemischer Bestandteile in der Reinigungsflüssigkeit (z. B. Methanol und Tenside) wurde hingewiesen. In MDCK-Zellen konnten BARBEE et al. (1999) keine Veränderungen in der Infektiosität von *C. parvum* feststellen, wenn die Oozysten zuvor mit quartärem Ammonium (1:128) behandelt wurden.

2. 9. 2. 5 Wasserstoffperoxid

Bei der Anwendung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) kommt es zur Entstehung von Sauerstoffradikalen, welche nicht nur mit der DNA interagieren sondern in eukaryotischen Organismen auch zum intrazellulären Einstrom von Kalzium führen (KNIEL et al., 2003). Bei Kryptosporidien wird in Anwesenheit von H_2O_2 in Kot die Durchlässigkeit der Oozystenwand für säurefeste Farbstoffe erhöht (ENTRALA et al., 1995). Zur Evaluierung eines Gasplasma-Sterilisationsverfahrens basierend auf einer Applikation von 6 mg/l H_2O_2 testeten VASSAL et al. (1998) die Infektiosität von Oozysten und konnten nach einem vollständigen Sterilisationszyklus von 75 min keinerlei Oozystenausscheidung in immunsupprimierten Ratten feststellen. In der Zellkultur (MDCK-Zellen) resultierte eine Exposition von Oozysten zu 6 % H_2O_2 über 10 min in einer Inaktivierung über drei Log-Stufen (BARBEE et al., 1999). Bei längeren Behandlungszeiten der Oozysten (13 min, 33 min) und gleicher Konzentration wurden keine Infektionsherde mehr detektiert (WEIR et al., 2002). In HCT-8-Zellen konnten KNIEL et al. (2004) gleiche Ergebnisse erzielen, wenn *C. parvum*-Oozysten vor Infektion über zwei Stunden mit 0,3 mg/l, 1 mg/l und 10 mg/l H_2O_2 inkubiert wurden.

Eine vollständige Wirkung dieser Substanz zeigte sich bei der Zugabe von 0,03 % H₂O₂ zu verschiedenen Fruchtsäften, die artifiziell mit dem Erreger kontaminiert wurden. Ohne Beeinträchtigung der Lebensmittelqualität waren die daraus gewonnen Oozysten nicht mehr infektiös für HCT-8-Zellen (KNIJL et al. 2003). Aufgrund der hohen Effektivität gegenüber *C. parvum* wird H₂O₂ in zeit- und konzentrationsabhängigen Versuchsreihen zur Evaluierung neuer Viabilitätstests (ALUM et al., 2011; LIANG und KEELEY, 2012) und in Studien zur Inaktivierung von *C. parvum* als Positivkontrolle verwendet (DELLING et al., 2017).

2.9.3 Kommerziell erhältliche Desinfektionsmittel

Zur Reinigung und Desinfektion von Stallungen stehen dem Landwirt/ der Landwirtin kommerziell erhältliche Produkte zur Verfügung, welche zumeist unterschiedliche chemisch wirksame Komponenten enthalten. Auch einige kommerzielle Desinfektionsmittel wurden im Labor auf ihre Wirksamkeit gegenüber Kryptosporidien getestet. Bezüglich der Exzystierungsrate berichteten HOLTON et al. (1994) von einer hohen Wirksamkeit auf *C. parvum* bei einstündiger Inkubation mit folgenden Desinfektionsmitteln: 5 % Pentapon DC1[®](Beta-en), 6 % Sactimed[®] (quartäres Ammonium) und 2 % Cidex[®] (Glutaraldehyd). Letzteres Produkt zeigte bei 2,4 %iger Konzentration und 45 min Einwirkzeit in der Zellkultur jedoch nur eine Reduktion um 0,3 Log-Stufen (BARBEE et al., 1999). Auch für CD-1-Swiss-Mäuse sind mit Aldehyden (AGRIGERM 1000[®]: 13,16 % Formaldehyd, 13,37 % Glutaraldehyd) behandelte Oozysten nach 2 h noch infektiös (CASTRO-HERMIDA et al., 2006). In dieser Studie kam man bei Anwendung von AGROOXYDE II[®], welches H₂O₂ (20-30 %), Peressigsäure (5 %) und Essigsäure (5-10 %) enthält, zu demselben Ergebnis (CASTRO-HERMIDA et al., 2006). Im Gegensatz dazu erzielten QUÍLEZ et al. (2005) bei Behandlung der Oozysten mit auf H₂O₂ basierenden Produkten eine effektive Inaktivierung des Parasiten. Die Autoren testeten Ox-Virin[®] (25 % H₂O₂, 5 % Peressigsäure) sowie Ox-Agua[®] (48 % H₂O₂, 0,05 % Silbernitrat) in verschiedenen Konzentrationen. Eine vollständige Reduktion der Infektiosität in BALB/c-Mäusen wurde durch Ox-Virin[®] ab 5 % bei 2 h Inkubation und durch Ox-Agua[®] ab 3 % bei 30 min Einwirkzeit erlangt. Eine zweistündige Behandlung mit dem auf Aminbasis wirkenden Desinfektionsmittel KENOTMCOX (2 %) ist ebenfalls ausreichend, um im Modell C57BI/6-Maus die Infektiosität zu unterbinden (NACIRI et al., 2011).

Desinfektionsmittel, die gegen einzellige Parasiten wirken, werden durch die DVG geprüft und in der DVG-Desinfektionsmittelliste mit der nötigen Konzentration und Einwirkzeit aufgeführt. Aufgrund der hohen Widerstandsfähigkeit wurde in Wirksamkeitsprüfungen gegen Kokzidien, Kryptosporidien und Giardien *E. tenella* als Testorganismus verwendet.

2 Literaturübersicht

Desinfektionsmitteltestungen auf antiprotozoäre Wirkung basierten daher im Wesentlichen auf In-vivo-Studien im Huhn, die von DAUGSCHIES et al. (2002) veröffentlicht wurden.

Wirkung gegen einzellige Parasiten zeigen nach DVG-Desinfektionsmittelliste vor allem Produkte auf Kresolbasis. Kommerziell erhältlich sind z. B. Neopredisan 135-1, Aldecoc[®]TGE und Aldecoc[®]XD, welche für *C. parvum* in der Zellkultur (HCT-8) eine hohe Effektivität in Form einer über 99,9 %igen Inaktivierung zeigten (SHAHIDUZZAMAN et al., 2010). Mit dem Ziel, den Tierversuch bei der Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln ersetzen zu können, wurde das von SHAHIDUZZAMAN et al. (2010) etablierte In-vitro-Modell in den letzten Jahren hinsichtlich seiner Anwendbarkeit auf Keimträgern (DRESELY et al., 2015) weiterentwickelt, und einige Optimierungsschritte wurden integriert (DELLING et al., 2017). Inzwischen ist die Prüfung von Desinfektionsmitteln am Modellorganismus *C. parvum* als DVG-Richtlinie anerkannt (DVG, 2019). Darin vorgeschrieben ist die Prüfung der Vermehrungsfähigkeit des Erregers nach 120 min Inkubation mit der Testsubstanz bei 10 °C und gegebenenfalls 20 °C im Suspensions- und im Keimträgertest.

Die Einbeziehung weiterer in der Praxis relevanter Faktoren, wie der Einfluss von Schmutzrückständen, sollen zukünftig bei der Wirksamkeitsprüfung berücksichtigt werden. Die konsequente und korrekte Desinfektion aller Stallungen auf einem Rinder haltenden Betrieb ist Grundvoraussetzung dafür, Kryptosporidiose hinreichend zu kontrollieren, reicht aber in Problembeständen alleine nicht aus (KEIDEL und DAUGSCHIES, 2013).

3 Publikation 1: Inactivation of *Cryptosporidium parvum* under laboratory conditions

Cora Delling*, **Ivette Holzhausen***, Arwid Dauschies, Matthias Lendner

*gleichwertige Autorenschaft

Publiziert in: Parasitology Research 2016; 115(2): 863-6. doi: 10.1007/s00436-015-4813-4

4 Seiten, 2 Abbildungen, 1 Tabelle, 17 Literaturangaben

Eigenanteil der Arbeit:

- Ivette Holzhausen ist eigenverantwortlich für das Studiendesign zur Inaktivierung von *C. parvum* mittels UV-Strahlung. Sie ist eigenverantwortlich für die durchgeführten Versuche und damit verbundenen Arbeiten im Labor und der Datengewinnung der chemischen Desinfektion für die Expositionszeiten 12 h und 24 h sowie für die Durchführung der physikalischen Inaktivierung mittels UV-Strahlung für die Expositionszeiten 10 min und 30 min. Des Weiteren ist sie eigenverantwortlich für die Auswertung der Ergebnisse der UV-Inaktivierung (Abbildung 2) und das Beschreiben der Materialien und der Methodik bezüglich der UV-Inaktivierung sowie der Erstellung der Abbildung 1.
- Cora Delling ist eigenverantwortlich für das Studiendesign der chemischen Desinfektion. Sie ist eigenverantwortlich für die Laborarbeiten und die Erhebung der Daten zur chemischen Desinfektion für die Expositionszeiten 30 min, 2 h und 4 h sowie für die Datenerhebung für Abbildung 1 und der UV-Bestrahlung für die Expositionszeit 20 min. Sie wertete die Daten der chemischen Desinfektion aus (Tabelle 1) und schrieb das Manuskript für die Publikation (ausgenommen Material und Methodik UV-Bestrahlung)
- Matthias Lendner hatte die Studienidee und ist verantwortlich für die kritische Überprüfung des Studiendesigns sowie der Durchführung der Versuche im Labor.
- Matthias Lendner und Arwid Dauschies sind verantwortlich für eine kritische Begutachtung des Manuskriptes hinsichtlich des fachlichen Inhalts.

4 Publikation 2: Distribution of *Cryptosporidium parvum* gp60 subtypes in calf herds of Saxony, Germany

Ivette Holzhausen, Matthias Lendner, Franziska Göhring, Ilka Steinhöfel, Arwid Dauschies

Publiziert in: Parasitology Research 2019; 118(5): 1549-1558. doi.org: 10.1007/s00436-019-06266-1

10 Seiten, 2 Abbildungen, 2 Tabellen, 84 Literaturangaben

Eigenanteil der Arbeit:

- Ivette Holzhausen ist eigenverantwortlich für die Planung der Laborarbeiten zur Subtypisierung der Isolate. Sie ist eigenverantwortlich für die Arbeiten im Labor, ausgenommen der Heine-Färbung, für die statistische Analyse und die Interpretation der in der Publikation enthaltenen Daten, sowie für die Auswertung der DNA-Sequenzen und für das Verfassen des Manuskripts.
- Matthias Lendner hatte die Studienidee zur molekulargenetischen Charakterisierung der Isolate.
- Franziska Göhring und Ilka Steinhöfel führten die Probenentnahmen und die Datenerhebung auf den Betrieben durch. Franziska Göhring führte außerdem die Heine-Färbung durch und Ilka Steinhöfel ist verantwortlich für das Studiendesign, welches zur Generierung der Isolate geführt hat.
- Arwid Dauschies ist verantwortlich für die Begutachtung des fachlichen Inhalts des Manuskriptes.

5 Publikation 3: Bovine *Cryptosporidium parvum* field isolates differ in cytopathogenicity in HCT-8 monolayers

Ivette Holzhausen, Matthias Lendner, Arwid Dauschies

Publiziert in: Veterinary Parasitology 2019; 273: 67-70. doi:10.1016/j.vetpar.2019.08.006

4 Seiten, 2 Abbildungen, 1 Tabelle, 19 Literaturangaben

Eigenanteil der Arbeit:

- Ivette Holzhausen ist eigenverantwortlich für die Laborarbeiten zur Zytopathogenitätsbestimmung der Isolate. Sie ist eigenverantwortlich für die statistische Analyse und die Interpretation der in der Publikation enthaltenen Daten, sowie das Verfassen des Manuskripts.
- Matthias Lendner hatte die Studienidee und unternahm erste Überlegungen zur Planung der Laborarbeiten.
- Arwid Dauschies ist verantwortlich für die Begutachtung des fachlichen Inhalts des Manuskriptes.

6 Diskussion

Kryptosporidien sind ubiquitär vorkommende parasitäre Einzeller, die resistent gegenüber einer Vielzahl von Umweltfaktoren sind (THOMSON et al., 2017). Insbesondere *C. parvum* ist in der Tiermedizin als Ursache von neonatalem Durchfall von enormer Bedeutung. Das Fehlen eines effektiven Therapeutikums lenkt den Fokus zur Bekämpfung des Parasiten in der Nutztierhaltung auf Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen, welche durch das zoonotische Potential auch während des gezielten Umgangs mit dem Erreger im Labor von großer Bedeutung sind. Ein Ziel der vorliegenden Studien war es daher chemische Substanzen und eine Art der physikalischen Inaktivierung bezüglich ihrer Wirksamkeit gegenüber *C. parvum*-Oozysten zu testen (PUBLIKATION 1). Da es sich bei der neonatalen Diarrhoe des Kalbes, an der *C. parvum* maßgeblichen Anteil hat, um ein multifaktorielles Geschehen handelt, ist eine Abschätzung des Beitrags eines einzelnen Erregers zur klinischen Ausprägung der Infektion schwierig. In dieser Hinsicht wäre auch zu berücksichtigen, dass sich Feldisolate von *C. parvum* in ihrer Virulenz unterscheiden können. In der vorliegenden Arbeit wurde daher auch die Zytopathogenität verschiedener *C. parvum*-Feldisolate *in vitro* evaluiert, um eine Abschätzung der Virulenz des Erregers unter standardisierten Laborbedingungen zu ermöglichen (PUBLIKATION 3). Da Kälber von einer Vielzahl genetisch unterschiedlicher *C. parvum*-Subtypen befallen werden können, wurden Kryptosporidien aus einer umfassenden Studie in Sachsen weiterhin molekulargenetisch charakterisiert und ein aktueller Überblick über die vorkommenden Subtypen gegeben (PUBLIKATION 2).

6.1 Chemische Desinfektion von *C. parvum* unter Laborbedingungen

JOACHIM et al. (2003b) haben gezeigt, dass in der veterinärmedizinische Diagnostiklabore den Parasiten in seiner Bedeutung als Primärpathogen oftmals unterschätzen. Diese Einschätzung dürfte bei praktizierenden Tierärzten/en/innen und Landwirten/en/innen ebenfalls weit verbreitet sein (GÖHRING et al., 2014). Da auch humanmedizinische Einrichtungen Stuhlproben mit unphysiologischer Konsistenz von erwachsenen Patient/en/innen nicht und von Kindern unter zwei Jahren nur teilweise routinemäßig auf Kryptosporidien untersuchen (GERTLER et al., 2015), muss die jährlich in Deutschland ermittelte Inzidenz humanpathogener *Cryptosporidium* spp. als deutlich unterschätzt gelten. In Europa kam es seit 2000 immer wieder zu größeren Kryptosporidiose-Ausbrüchen beim Menschen, die zum Teil mit Tierkontakt oder Kontamination der Umwelt aus der Tierhaltung in Zusammenhang gebracht werden konnten (CACCIÒ und CHALMERS, 2016). Für diagnostische Labore, die möglicherweise kryptosporidienhaltiges Untersuchungsmaterial zugestellt bekommen, oder Forschungseinrichtungen, die gezielt mit *C. parvum* umgehen, ist aus Arbeitsschutzgründen besondere Vorsicht geboten. Hierzu gehört die Verwendung von wirksamen

Dekontaminationsmaßnahmen vor und nach dem Arbeiten, um die Gefahr der akzidentellen Infektion zu vermindern.

DVG-gelistete Desinfektionsmittel für die Tierhaltung, die eine ausreichende Effektivität gegenüber Kryptosporidien-Oozysten aufweisen, enthalten vor allem Kresolverbindungen. Diese Substanzen sind aufgrund ihrer korrosiven Eigenschaften zur Desinfektion im Labor mit hochsensiblen Geräten jedoch ungeeignet. Ethanol, H₂O₂ und NaOCl sind weniger aggressiv und in den meisten Laboren als Grundchemikalie vorhanden. Deshalb wurden diese Substanzen auf die inaktivierende Wirkung untersucht. Die Evaluation der Wirkung auf *C. parvum*-Oozysten erfolgte *in vitro* im Suspensionstest mit einer Kombination aus Zellkultur und quantitativer Real-Time-PCR. Dieses Modell wurde von SHAHIDUZZAMAN et al. (2009) entwickelt und bereits zur Testung verschiedener Desinfektionsmittel gegen *C. parvum* angewendet (SHAHIDUZZAMAN et al., 2010). Nach Integration eines Keimträgertests (DRESELY et al., 2015) sowie verschiedener Optimierungen (Exzystierungszeit von 3 h, DNA-Gewinnung 24 h p.i.; DELLING et al., 2017) wurde dieses Modell als Prüfrichtlinie der DVG zur Desinfektionsmitteltestung für die Tierhaltung im Februar 2019 festgelegt (DVG, 2019). Gegenwärtig ist das Modell als *preliminary work item* in der Evaluation mit dem Ziel der Festlegung als Norm des *Comité Européen de Normalisation* (CEN).

Davor war die Listung eines Desinfektionsmittels mit antiprotozoärer Wirkung nur nach Testung am Modellorganismus *E. tenella in vivo* möglich. Die Vergleichbarkeit von In-vivo- und In-vitro-Verfahren zur Testung von Antikozidien untersuchten THABET et al. (2017) anhand der Infektion von MDCK-Zellen mit *E. tenella*-Oozysten verschiedener Isolate und einer quantitativen Real-Time-PCR des *ITS-1*-Gens. Die In-vitro-Ergebnisse korrelierten signifikant mit dem Hühnermodell (THABET et al., 2017). Zu demselben Schluss kamen SHAHIDUZZAMAN et al. (2010) beim Vergleich der Ergebnisse aus Inaktivierungsstudien mit *E. tenella* im Huhn und der Testung von *C. parvum* im Zellkultur-Assay, sodass der Tierversuch im Rahmen der Desinfektionsmittelprüfung abgeschafft werden konnte, was im Zuge des 3R-Prinzips einen wichtigen Schritt darstellt. Mit der Festlegung der DVG-Prüfrichtlinie auf *C. parvum* als Modellorganismus für alle protozoären Pathogene steht nun ein Verfahren zur Prüfung an einem hoch resistenten Erreger zur Verfügung (SPANNO et al., 1997).

Zur Bewertung der Infektiosität von *C. parvum*-Oozysten gilt das Mausmodell als Goldstandard (ROCHELLE et al., 2002). Jedoch stellen auch für diesen Erreger, wie oben bereits angesprochen, Zellkulturen eine geeignete Alternative zum Tierversuch dar, die sogar Vorteile gegenüber dem In-vivo-Bioassay aufweisen (ROCHELLE et al., 2002; SLIFKO et al., 2002). SLIFKO et al. (2002) stellten eine geringere Variabilität und eine höhere Sensitivität im Zellkultur-Assay fest. Die Autoren beurteilten infizierte Monolayer im Gegensatz zur aktuellen Arbeit nach Ak-Markierung von Parasitenherden und führten keine Quantifizierung durch. ALUM et al. (2011) verwendeten HCT-8-Zellen und amplifizierten nach der Inokulation mit dem Erreger die RNA des *C. parvum*-Enzyms

Amyloglukosidase. Eine Quantifizierung wurde mit Hilfe von Messungen der Bandenintensität bei der Visualisierung der PCR-Produkte auf einem Agarosegel vorgenommen. Die Werte für die Inaktivierung der Oozysten korrelierten sehr gut mit Ergebnissen, die *in vivo* erzielt wurden (ALUM et al., 2011). ROCHELLE et al. (2002) evaluierten eine Kombination aus Zellkultur und Amplifikation der extrahierten *hsp70*-mRNA hinsichtlich ihrer Eignung zum Ersatz des Mausmodells. In dieser Studie zeigte sich, dass HCT-8-Zellen im Vergleich zu Caco- oder MDCK-Zellen für Infektionsversuche mit *C. parvum in vitro* am besten geeignet sind. Abgesehen von der unterschiedlichen Matrix für die PCR (mRNA bzw. DNA) ist die in der vorliegenden Studie angewandte Methodik mit den Assays von ROCHELE et al. (2002) und ALUM et al. (2011) vergleichbar, sodass eine Übertragbarkeit der In-vitro-Ergebnisse auf die Situation *in vivo* angenommen werden kann. Im Sinne des 3R-Prinzips ist dies ein wichtiger Befund.

SHAHIDUZZAMAN et al. (2010) schlugen 99,5 % als Grenzwert für die Zertifizierung einer effektiven Inaktivierung von *C. parvum* nach 2 h Inkubation mit Desinfektionsmitteln im Zellkultur-Assay vor. Aufgrund früherer Studien, in denen kürzere Einwirkzeiten getestet wurden (BARBEE et al., 1999; WEIR et al., 2002) war zu erwarten, dass dieser Wert in der vorliegenden Studie weder von denaturiertem Ethanol noch von 70 %igem oder 100%igem Ethanol erreicht wird. Tatsächlich lagen die Inaktivierungswerte nach 2 h bei nur 99,21 %, 90,41 % bzw. 96,79 %. Es konnte bestätigt werden, dass über die Anwendung in Laboren üblicher Desinfektionssubstanzen, keine hinreichende Dekontamination von Kryptosporidien zu erreichen ist.

Auch die Resistenz der Oozysten gegenüber Chlorverbindungen ist bekannt (VENCZEL et al., 1997). Da eine Konzentration von 6 % NaOCl über 33 min zu keiner signifikanten Abnahme von Infektionsherden in HCT-8-Zellen führte (WEIR et al., 2002), wurden in der aktuellen Studie auch längere Einwirkzeiten evaluiert. Bei den getesteten NaOCl-Konzentrationen von 3 % und 6 % zeigte sich erst nach Exposition der *C. parvum*-Oozysten über mindestens 12 h eine ausreichende Inaktivierung. Durch die Benötigung einer solch langen Einwirkzeit ist die Anwendung von NaOCl zur Oberflächendekontamination in Laboren ausschließlich nach Beendigung der Experimente eines Arbeitstages möglich.

Am effektivsten war H_2O_2 in einer Konzentration von 10 %. In dieser Konzentration konnten ab 2 h Inkubation annähernd 99,5 % Inaktivierung erreicht werden. Basierend auf den Ergebnissen früherer Studien, in denen 6 % H_2O_2 nach 10 min (BARBEE et al., 1999) bzw. 13 min (WEIR et al., 2002) zu einer Inaktivierung von über drei Log-Stufen in der Zellkultur führte, wird H_2O_2 in dieser Konzentration als Positivkontrolle zur Evaluierung von Viabilitäts- und Infektiositätstests verwendet (ALUM et al., 2011; LIANG und KEELEY et al., 2012). In der aktuellen Arbeit blieb die Inaktivierung durch 10 % H_2O_2 bei einer kurzen Inkubationzeit von 30 min mit 97,29 % unter den von BARBEE et al. (1999) und WEIR et al. (2002) berichteten Werten. Die Verwendung von MDCK-Zellen durch BARBEE et al. (1999), welche sich bei einem Vergleich von 12 kontinuierlichen

Zelllinien gegenüber HCT-8-Zellen als schlechter für die Infektion von *C. parvum* geeignet erwiesen (UPTON et al., 1994), ist eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der Ergebnisse. Eine methodische Abweichung zum aktuellen Zellkultur-Assay ist auch bei WEIR et al. (2002) vorhanden. Die Autoren färbten infizierte HCT-8-Zellmonolayer mit Sporo-Glo™ und zählten die Objektträger bei einer Anzahl von zehn bis 100 Infektionsherden mikroskopisch aus. Geringer infizierte Monolayer wurden bei der Quantifizierung also nicht berücksichtigt. Eine anschließende Real-Time-PCR zur Detektion vorhandener *C. parvum*-DNA, wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, ist demgegenüber sensitiver und erlaubt in jedem Fall eine Quantifizierung der parasitären Replikation.

Als chemische Positivkontrolle für eine Desinfektionsmittelprüfung ist H₂O₂ nach den eigenen Erfahrungen nur in höheren Konzentrationen zu verwenden. Dies wurde bereits von DELLING et al. (2017) diskutiert. Vor diesem Hintergrund wurde in der Prüfrichtlinie der DVG die höchstmögliche Konzentration von 30 % H₂O₂ bei 2 h Inkubationsdauer festgelegt (DVG, 2019).

Zusammenfassend kann man sagen, dass denaturiertes Ethanol und Ethanol keine geeigneten Substanzen für die Oberflächendekontamination in Laboren darstellen. Die Anwendung von NaOCl oder H₂O₂ lässt sich durch die nötige Einwirkzeit von 12 h bzw. 2 h eher schwer in die Arbeitsabläufe zwischen zwei Versuchen integrieren. Eine akzidentielle Infektion kann jedoch nach jeder Tätigkeit mit dem Erreger erfolgen. Für eine Behandlung der Oberflächen am Ende eines Arbeitstages ist insbesondere 10 %iges H₂O₂ durch die doch erheblich kürzere Inkubationszeit gegenüber NaOCl geeignet und trägt zur Verringerung des Infektionsrisikos für die im Labor arbeitenden Personen bei.

6.2 Physikalische Inaktivierung von *C. parvum* mittels UV-Bestrahlung

Sterilwerkbänke sind für gewöhnlich mit UV-Lampen zur Erregerinaktivierung ausgestattet. Im Vorfeld zur aktuellen Studie und im Hinblick auf Beschränkungen der Eignung chemischer Desinfektion stellte sich daher die Frage, inwieweit diese Art der Oberflächendekontamination geeignet ist Kryptosporidien zu inaktivieren. In Studien, welche eine hinreichende Wirkung von UV-Strahlung aufzeigen befanden sich die *C. parvum*-Oozysten während der Behandlung ausschließlich in Suspension. Von Interesse war daher die Evaluation der Infektiosität UV-bestrahlter Oozysten auf Oberflächen. Dafür steht ein standardisierter Keimträgertest zur Verfügung (DRESELY et al., 2015), der Bestandteil der aktuellen DVG-Prüfrichtlinie ist (DVG, 2019).

Im Keimträgertest wird durch das Auftragen der Oozysten auf Edelstahlscheiben mit 20 mm Durchmesser die Kontamination einer Oberfläche simuliert, was die Desinfektion von Arbeitsflächen im Labor, aber auch in Tierstallungen, praxisnah nachbilden soll. In früheren Studien wurde von der Schwierigkeit der Rückgewinnung der zu testenden Oozysten nach längerer Umweltexposition berichtet (ROBERTSON und GJERDE, 2004). DRESELY et al. (2015) konnten mittels Zugabe von

0,03 % bovinem Serumalbumin (BSA) die Rückgewinnungsrate der Oozysten nach 30 min Antrocknung auf dem Keimträger bedeutend verbessern. BSA wird für gewöhnlich zur Simulation von eiweißlastigen Verschmutzungen verwendet, welche die Effizienz eines Desinfektionsmittels stark beeinflussen können (SASSONNE et al., 2008; DRESELY et al., 2015). Die Testung von Inaktivierungsverfahren unter standardisierten Laborbedingungen ist dadurch realitätsnaher. Aufgrund dieser beiden Gesichtspunkte (Erhöhung der Rückgewinnungsrate, Simulation von Verschmutzungen) erfolgte auch in der aktuellen Arbeit die Zugabe von BSA zur Oozystensuspension. Die Expositionszeiten wurden so gewählt, dass eine Dekontamination der Sterilwerkbank zwischen zwei Arbeitsvorgängen im Labor noch praktikabel ist und keine längeren Verzögerungen der Arbeitsabläufe nach sich zieht.

Bei der Anwendung von UV-Licht ist die Strahlungsleistung (W/cm^2) maßgeblich von der verwendeten UV-Quelle und dem Abstand zum bestrahlten Objekt abhängig. In Kombination mit der Bestrahlungsdauer (min) ergibt sich eine Vielzahl möglicher Intensitäten (mJ/cm^2), die auf den Erreger einwirken. Durch die unterschiedlichen Anwendungsprotokolle bisheriger Studien ist auch bei diesem Aspekt der aktuellen Studienergebnisse ein Vergleich mit bekannten Inaktivierungsraten nicht ohne Einschränkungen möglich (ERICKSON und ORTEGA, 2006).

In der aktuellen Arbeit wurden über die Bestrahlungsdauer drei verschiedene UV-Intensitäten im Bereich $33,6 \text{ mJ}/\text{cm}^2$, $67,2 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ und $100 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ angewendet. Eine Inaktivierung von *C. parvum* von über 99 % wurde nur durch die höchste Intensität erreicht. $100 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ als nötige Intensität für eine Reduktion der Infektiosität um zwei Log-Stufen erscheinen im Vergleich zu bisherigen Studien als sehr hoher Wert. BUKHARI et al. (1999) inaktivierten *C. parvum* bereits bei einer Bestrahlungsintensität von $41 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ vollständig. CLANCY et al. (2000) erreichten mit $33 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ eine Reduktion von $2,7 \log_{10}$. BELOSEVIC et al. (2001) berichteten von einer Inaktivierung um vier Log-Stufen bei Bestrahlung der Oozysten mit $60 \text{ mJ}/\text{cm}^2$. Im Gegensatz zu den aktuellen Ergebnissen basieren diese Daten jedoch auf Testungen der Infektiosität bestrahlter Oozysten im Mausmodell, welche wiederum mit unterschiedlichen Infektionsdosen eines *C. parvum*-Laborisolats (*Iowa strain*) durchgeführt wurden.

BUKHARI et al. (1999) und CLANCY et al. (2000) entnahmen 2-3 cm des terminalen Ileums einer infizierten Maus und evaluierten den Objektträger qualitativ auf das Vorhandensein von *C. parvum*. Entwicklungsstadien, welche Epithelzellen eines anderen Darmabschnitts befallen haben, wurden nicht berücksichtigt. In der aktuellen Arbeit wurde dagegen eine Quantifizierung der *C. parvum*-DNA für den gesamten inokulierten Zellmonolayer durchgeführt. Auch bei Anwendung von In-vitro-Modellen ist oft von höheren Inaktivierungsraten bei niedrigerer UV-Intensität zu lesen, als es in den eigenen Studien der Fall war. Beispielsweise wurde *C. parvum* im Zellkultur-Assay unter Anwendung von Bestrahlungsintensitäten in einem vergleichbaren Bereich ($40 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) vollständig inaktiviert (ENTRALA et al., 2007). Die Infektionsherde wurden mittels Ak-Markierung sichtbar gemacht und

der gesamte Zellmonlayer wurde auf *parasitic foci* untersucht (ENTRALA et al., 2007). Die Bezeichnung *parasitic foci* wurde jedoch nicht genau definiert, sodass unklar ist, ob auch einzelne Erreger in der Kultur detektiert wurden. Diese methodischen Unterschiede stellen eine Begründung dafür dar, dass es in den zitierten Studien (BUKHARI et al., 1999; CLANCY et al., 2000; ENTRALA et al., 2007) möglicherweise zu einer Überschätzung der Inaktivierungsraten gegenüber den Ergebnissen der eigenen Arbeit kam.

Die Studie von KEEGAN et al. (2003) ist dem aktuell angewendeten Assay methodisch am nächsten, was auch die ähnlichen Inaktivierungsraten erklärt. Die Autoren wendeten eine Kombination aus Zellkultur und quantitativer Real-Time-PCR des *C. parvum-18S*-Gens nach Bestrahlung der Oozysten mit 30 mJ/cm^2 an und ermittelten eine Reduktion der Infektiosität um 2,2 Log-Stufen.

Ein direkter Vergleich zwischen Daten aus dem Suspensionstest, der den zitierten Studien zugrunde liegt, und aus dem Keimträgertest der eigenen Arbeit ist generell problematisch. Letztlich ist aber festzustellen, dass für die Prüfung von Dekontaminationsmaßnahmen auf Oberflächen der Keimträgertest die bei weitem geeignetere Methodik darstellt. Aus diesem Grund fordern die DVG-Richtlinien auch zwingend die Durchführung des Keimträgertest.

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Infektiosität von *C. parvum*-Oozysten durch die Behandlung mit UV-Licht bei 100 mJ/cm^2 eine effektive Methode zur Dekontamination glatter Oberflächen darstellt. Der von SHAHIDUZZAMAN et al. (2010) vorgeschlagene Inaktivierungswert von 99,5 % wurde nicht erreicht. Das kann jedoch durchaus daran liegen, dass nicht der Suspensionstest sondern der praxisnähere Keimträgertest verwendet wurde, welcher im Allgemeinen anspruchsvoller ist. Immerhin wurden mehr als 95 % der Oozysten inaktiviert, was den Ansprüchen nach Richtlinie der DVG für chemische Desinfektionsmittel genügen würde (DVG, 2019). Da UV-Lampen zum Zweck der Erregerinaktivierung in Sterilwerkbanken eingebaut sind, lässt sich dieses Verfahren gut in den Arbeitsablauf eines mit Kryptosporidien arbeitenden Labors eingliedern. Für die Behandlung anderer Arbeitsflächen wäre die Installation zusätzlicher UV-Lampen nötig, welche unter Berücksichtigung der entsprechenden Leistung der Strahlungsquelle und des Abstandes zum bestrahlten Arbeitsbereich sowie des Arbeitsschutzes eingesetzt werden könnten. Ein klarer Vorzug der Dekontamination mittels UV-Licht gegenüber chemischen Desinfektionsmitteln ist, dass keinerlei giftige, korrosive oder geruchsintensive Stoffe in die Umwelt ausgebracht werden.

Für eine Keimabtötung in Tierställen hat die UV-Strahlung bisher keine nennenswerte Bedeutung (ZUCKER, 2017). In Hinblick auf den hohen Verschmutzungsgrad in diesem Bereich erfordert die Integration eines (mobilen) UV-Gerätes mit entsprechender Technologie noch sehr viel Forschung und Engagement seitens der Landwirtschaft und der Veterinärmedizin.

6.3 Nachweisraten von *Cryptosporidium* spp. in Sachsen

In der Tiermedizin, insbesondere bei Kälbern, stehen oft die wirtschaftlichen Einbußen einer Kryptosporidien-Infektion durch erhöhte Behandlungskosten, verminderte Leistung und die höhere Sterblichkeit infizierter Kälber im Vordergrund (DE GRAAF et al., 1999). Ein regelmäßiges Screening von Kotproben durch den Landwirt/die Landwirtin selbst oder den betreuenden Tierarzt/die betreuende Tierärztin würde zur Verdeutlichung der Relevanz von Kryptosporidien und dem hohen Grad an Kontamination der Umwelt mit Oozysten beitragen und könnte damit die Sensibilität für diesen Erreger in der Kälberhaltung steigern. Allerdings stehen diesem Anspruch Aspekte von Aufwand und Kosten entgegen. Regionale epidemiologische Studien, wie die Statuserhebung zur aktuellen epidemiologischen Situation der Kälberkryptosporidiose in Sachsen in der vorliegenden Arbeit (PUBLIKATION 2), können dazu beitragen, dass in Landwirtschaft und Tiermedizin mehr Aufmerksamkeit erzeugt wird. Zeitnah laufende andere epidemiologische Studien der Arbeitsgruppe (KEWITZ et al., 2019) wurden genutzt, um Feldisolate zur genaueren Charakterisierung hinsichtlich der genetischen (PUBLIKATION 2) und zytopathogenen Eigenschaften (PUBLIKATION 3) des Parasiten zu gewinnen.

Hinsichtlich der Häufigkeit von Kryptosporidien in Rindern in Deutschland sind in der Literatur sehr divergierende Angaben zu finden, was insbesondere auf die unterschiedlichen Studiendesigns zurückzuführen ist. JOACHIM et al. (2003b) und RAUE et al. (2017) analysierten retrospektiv Daten von Kotprobeneinsendungen veterinärmedizinischer Diagnostiklabore. JOACHIM et al. (2003b) bezogen außerdem die Ergebnisse von postmortalen Untersuchungen ein. In dieser Studie wurden im Zeitraum 1993 bis 1997 23 % der Kotproben bzw. Tierkörper positiv auf Kryptosporidien befundet. RAUE et al. (2017) berichteten über zehn Jahre (2003-2012) einen Wert von 39,9 % positiver Proben. Eine Betrachtung der Befunde bezüglich des Alters der Rinder wurde in diesen Studien nicht vorgenommen. Dieser Aspekt ist bei der Einschätzung der Kryptosporidiose jedoch zwingend zu berücksichtigen, da sich *C. parvum* im Allgemeinen nur bei Kälbern in den ersten Lebenswochen als Durchfallerreger klinisch zeigt, während der Parasit in älteren Tieren nur selten nachweisbar ist und noch seltener eine Erkrankung verursacht (SANTÍN et al., 2004; 2008). Wenn der Probenpool nicht auf die Risikogruppe der jungen Kälber beschränkt wird, kommt es zwangsläufig zu einer Unterschätzung des Vorkommens von *C. parvum* als Ursache des neonaten Durchfalls.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Studienkohorte daher auf Kälber bis vier Wochen Alter zum Studienbeginn beschränkt. Mit einer dreimaligen Beprobung im Abstand von einer Woche wurde die durchschnittliche Patenzperiode der Infektion von sieben Tagen (FAYER et al., 1998a) berücksichtigt. Dieses Vorgehen wurde gewählt, weil bei einmaliger Beprobung, wie es in früheren Studien oft gehandhabt wurde, die Gefahr des Übersehens einer Infektion, die sich z. B. noch in der Präpatenz befindet, verbunden ist. Mit dem gewählten Studiendesign (PUBLIKATION 2) konnte wie erwartet

mit 88,9 % eine wesentlich höhere *C. parvum*-Prävalenz in der Zielgruppe nachgewiesen werden, als dies in Kohorten unbekannter Altersstruktur (JOACHIM et al., 2003b; RAUE et al. 2017) oder mit nur einmaliger individueller Beprobung (GÖHRING et al., 2014) möglich war.

In der Studie von GÖHRING et al. (2014) erschien vor allem interessant, dass in fast allen (92,9 %) Betrieben mindestens ein Tier Kryptosporidien ausschied. Auch in der vorliegenden Arbeit (PUBLIKATION 2) wurde in nahezu jedem Betrieb in Sachsen mindestens ein Ausscheider detektiert. Diese Ergebnisse bestätigen in einem regionalen Rahmen, dass *C. parvum* in Deutschland als ubiquitärer Erreger bei jungen Kälbern anzusehen ist. Wie in einer Langzeitstudie von SANTÍN et al. (2008) gezeigt, kann davon ausgegangen werden, dass in einer infizierten Herde alle Kälber in ihrem Leben mindestens einmal eine Kryptosporidien-Infektion durchlaufen. Da es sich um eine natürliche Exposition handelt, die initiale Infektionsdosis und der Infektionszeitpunkt unbekannt sind und die Patenz dadurch gegenüber experimentell infizierten Tieren (FAYER et al., 1998a) erheblich abweichen kann, würde nur eine tägliche Kotprobenentnahme in den ersten vier Lebenswochen das tatsächliche Ausmaß der Durchseuchung präzise aufzeigen. Ein derartiger Aufwand ist in epidemiologischen Feldstudien jedoch schwer umsetzbar. Immerhin kann mit dem Vorgehen der eigenen Studie hinreichend sicher bestätigt werden, dass praktisch jedes Kalb in den ersten Lebenswochen exponiert ist.

Auch die angewendete Nachweismethode hat Einfluss auf die Anzahl positiver Proben. GÖHRING et al. (2014) wendeten sowohl die Karbolfuchsin-Färbung nach HEINE (1982) an (43,3 % positiver Proben) als auch den Antigen-EIA (60,8 % positive Proben). In einer Untersuchung in Süddeutschland, in welcher nur Kälber mit Durchfall beprobt wurden, lagen die Ergebnisse, obwohl zwei verschiedene Nachweisverfahren (Heine-Färbung: 41,3% positiv, kommerzieller ELISA: 45,3 % positiv) verwendet wurden, dagegen sehr eng beieinander (GILLHUBER et al., 2014). Kryptosporidien wurden von GILLHUBER et al. (2014) in 47,6 % der Proben mit mindestens einer Nachweismethode detektiert.

Die große Gesamtzahl der zu untersuchenden Kotproben erforderte in der vorliegenden Studie ein einfaches und kostengünstiges Nachweisverfahren. Die Heine-Färbung erfüllt diese Anforderungen und erlaubt zumindest eine semiquantitative Auswertung der Oozystenausscheidung. Die absoluten Zahlen der Auszählung von zehn zufällig ausgewählten Zählfeldern wurden, angelehnt an CHARTIER et al. (2013) und RIEUX et al. (2013), durch einen *excretion score* objektiviert. Die semiquantitative Auswertung von gefärbten Kotausstrichen in dieser Form korreliert signifikant mit der direkten Immunfluoreszenz (CHARTIER et al., 2013), erfordert jedoch kein sehr spezielles Equipment. Die Heine-Färbung ist in vielen Diagnostiklaboren (JOACHIM et al., 2003b; RAUE et al., 2017) zum Nachweis von Kryptosporidien etabliert und trotz der geringeren Sensitivität gegenüber molekulargenetischen (z. B. PCR) oder immunologischen (z. B. Immunfluoreszenz) Nachweismethoden, für das Herdenscreening sehr gut geeignet (KUHNERT-PAUL et al., 2012).

Um das Hauptsymptom einer Kryptosporidiose, den Durchfall, qualitativ beurteilen zu können, wurde die Konsistenz der Kotproben in der aktuellen Studie (PUBLIKATION 2) mit einem fünfstufigen *faecal score* bewertet, wobei ein Score > 2 als Durchfall definiert war. Es zeigte sich, dass unabhängig vom Infektionsstatus die Mehrzahl der beprobten Kälber (86 %) eine unphysiologische Kotkonsistenz aufwiesen. Zudem wurde festgestellt, dass Kryptosporidien ausscheidende Tiere signifikant häufiger Durchfall hatten als nicht infizierte Tiere (88,4 % vs. 64,9 %).

Die Rolle des einzelligen Parasiten als Primärpathogen für neonatalen Durchfall wird in der Literatur seit Langem intensiv und teils kontrovers diskutiert. Bei Kälbern, die unter identischen Bedingungen (Alter, Futter, Infektionsdosis, Isolat) experimentell mit *C. parvum* infiziert wurden, zeigten sich starke individuelle Abweichungen hinsichtlich der Schwere und der Dauer des Durchfalls (FAYER et al., 1998a). Auch klinisch gesunde Tiere können Oozysten ausscheiden (TROTZ-WILLIAMS et al., 2006; CASTRO-HERMIDA et al., 2011). Daher ist es nicht verwunderlich, dass bei natürlich infizierten Tieren nicht immer ein signifikanter Zusammenhang zwischen Oozystenausscheidung und Durchfall gezeigt werden konnte (SNODGRASS et al., 1986; BJÖRKAMN et al., 2003). Zusätzlich zur Variabilität des Infektionsgeschehens kann insbesondere unter Feldbedingungen auch ein uneinheitliches Beprobungsregime oder die Auswahl einer ungeeigneten Kohorte das klinische Potential der Kryptosporidien überdecken.

ZAMBRISKI et al. (2013) berichteten bei Verabreichung unterschiedlich vieler Oozysten einen dosisabhängigen Zusammenhang zwischen Infektion und Oozystenausscheidung mit Durchfall. Übereinstimmend mit der aktuellen Arbeit wird in einer Vielzahl von Feldstudien zunehmend die bedeutende Rolle von *C. parvum* im Durchfallgeschehen bei neugeborenen Kälbern betont (BARTELS et al., 2010; CHO et al., 2013; GÖHRING et al. 2014; GARRO et al., 2016; DÍAZ et al., 2018). Sonstige Faktoren in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung, die das eher unspezifische Symptom Durchfall beeinflussen können (z. B. Infektionen mit anderen Enteropathogenen, Kolostrummanagement, Immunstatus des Kalbes, Reinigungs- und Desinfektionsmanagement) wurden in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt, werden aber aktuell in der Arbeitsgruppe analysiert (KEWITZ et al., 2019).

6.4 Zytopathogenität der *C. parvum*-Feldisolate

Im Fokus der eigenen Untersuchungen standen auch Überlegungen, ob und wie Feldisolate im Labor charakterisiert werden können (PUBLIKATION 3). Histopathologisch ist die intestinale Kryptosporidiose geprägt durch eher unspezifische Veränderungen: Villusatrophie und -fusion, Hyperplasie der Kryptenzellen (HEINE et al., 1984b) und Einstrom von Entzündungszellen in die *Lamina propria* (LUMADUE et al., 1998). Der daraus resultierende Durchfall ist sowohl

sekretorischer Natur, wird aber auch durch Malabsorption herbeiführt (ARGENZIO et al., 1993). In histologischen Untersuchungen des Darms experimentell mit *C. parvum* infizierter Schweine wurden apoptotische Zellen (Nachweis Caspase-3-Aktivität) vor allem im Darmlumen und an der Spitze der Villi gefunden. Gleichzeitig ist in infizierten Zellen die NF- κ B-Aktivität erhöht, womit die Darmbarriere aufrechterhalten wird (FOSTER et al., 2012). Auch im Mausmodell (SASAHARA et al., 2003) und im Kolon von infizierten AIDS-Patient/en/innen (LUMANDUE et al., 1998) wurden in Biopsien des Darms morphologische Veränderungen gefunden, die typisch für eine Apoptose sind.

Die Voraussetzung für eine Manifestation dieser histopathologisch nachvollziehbaren Veränderungen ist die Invasion des Erregers in die Enterozyten des Wirtes. Auch wenn die Langzeitkultivierung von *C. parvum in vitro* bisher in keinem Modell in ausreichendem Maß möglich war, ist der initiale Schritt der Invasion und die beginnende asexuelle Vermehrung in Zellkulturen visuell sehr gut nachvollziehbar (HIJAWI et al., 2001; HUANG et al., 2004). Bereits in den 1990er Jahren wurde *in vitro* nachgewiesen, dass es in Folge einer Infektion mit *C. parvum* in einer intestinalen Zelllinie (T84) zur Störung der epithelialen Barrierefunktion und zur vermehrten Ausschüttung von Laktatdehydrogenase (LDH) kommt (ADAMS et al., 1994). GRIFFITHS et al. (1994) bestätigten diese Ergebnisse, die auf eine Zellnekrose hinweisen, in Caco-Zellkulturen. Die Erkenntnisse über die Invasionsvorgänge und die Zytopathogenität, die auf biochemischer Ebene ablaufen, sind für *Cryptosporidium* jedoch sehr spärlich.

In Epithelzellen der menschlichen Gallenblase (H69) wurde erstmals die direkt zellschädigende Wirkung (Kondensation, Marginalisierung und Fragmentierung des Zellkerns) von *C. parvum* gezeigt (CHEN et al., 1998). Weitere Studien an infizierten H69-Zellen beweisen, dass die Anzeichen von Apoptose dosisabhängig bereits 12 h p. i. auftauchen (CHEN et al., 1999), dass die Fas/FasL entscheidend für die auto- und parakrin vermittelte Apoptose sind (CHEN et al., 1999) und dass eine Infektion mit *C. parvum* zur Translokation von NF κ B in den Zellkern führt, was durch Induktion der IL-8-Sekretion die Apoptose in nicht direkt infizierten Nachbarzellen auslöst (CHEN et al., 2001). Auch McCOLE et al. (2000) sahen in intestinalen Zelllinien (HCT-8, Caco) Anzeichen einer Apoptose zum größeren Teil in Zellen, die nicht selbst mit *C. parvum* infiziert waren und vermuteten, dass NF κ B an diesem Phänomen beteiligt ist.

In der vorliegenden Studie (PUBLIKATION 3) wurde ein Zellkulturmodell verwendet, um zu untersuchen, ob sich angenommene Virulenzunterschiede von Feldisolaten über die Zytopathogenität darstellen lassen. Dazu wurden Oozysten aus den Kotproben der positiv auf Kryptosporidien getesteten Kälber nach der Methode von JOACHIM et al. (2003a) gewonnen. Da es nicht immer möglich ist aus einer individuellen Kotprobe Oozysten in einer ausreichenden Menge zu gewinnen, wurden positive Kotproben je Betrieb gepoolt. Damit ist die Einschränkung verbunden, dass sich eine Variabilität aus der gleichzeitigen Anwesenheit von unterschiedlich virulenten Isolaten in einem

Betrieb auf die Ergebnisse auswirken könnte. Diese Möglichkeit besteht, ließ sich unter den gegebenen Umständen, die sich aus der Arbeit mit Feldisolaten ergibt, jedoch nicht eliminieren.

In der Zellkultur wurde im Wesentlichen dem etablierten Infektionsprotokoll von JOACHIM et al. (2003a) gefolgt. 24 h p. i. wurde die Viabilität infizierter Zellmonolayer mittels eines 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromid(MTT)-Assays bestimmt, wie bereits von GÖHRING et al. (2012) durchgeführt. Der MTT-Assay wird in der Regel zur Abschätzung der Zytotoxizität von Medikamenten (VISTICA et al., 1991) oder Desinfektionsmitteln (JOACHIM et al., 2003a) genutzt und beruht auf dem Nachweis eines Formazans, welches nur in lebenden Zellen aus der Reduktion von MTT entsteht. Durch die Kombination von In-vitro-Infektion und der Messung des gebildeten Formazans kann der Anteil toter Zellen nach Infektion mit *C. parvum*-Oozysten, welche übertragen auf den Darm des Wirtstieres letztendlich Durchfall verursachen, in Zusammenhang gebracht werden.

Anhand von In-vivo-Studien wurde bereits früher vermutet, dass die Virulenz von Kryptosporidien zwischen verschiedenen Isolaten variiert (FAYER und UNGAR, 1986) und Eigenschaften des Parasiten neben anderen Einflussfaktoren (Wirt, Umwelt) direkt die Schwere der klinischen Erkrankung bestimmen. Die Autoren begründeten diese Aussage über den Vergleich von zwei identischen Tierversuchen, in denen die Probanden mit unterschiedlichen *Cryptosporidium*-Isolaten infiziert wurden. Es wurde gezeigt, dass ein Isolat in einer sehr hohen Infektionsdosis nicht in allen Kälbern klinische Symptome auslöste, die Infektion mit einer erheblich geringeren Infektionsdosis (0,2 %) dagegen in allen Tieren erfolgreich war (FAYER et al., 1985; FAYER und UNGAR, 1986). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch POZIO et al. (1992) nach der Infektion von 23 männlichen Kälbern derselben Rasse und desselben Alters mit vier Isolaten, die sich hinsichtlich der Ausscheidungsintensität und des Durchfallverlaufs unterschieden. Außerdem ermittelten die Autoren über einen längeren Zeitraum monatlich die spontane Exzystierungsrate von Oozysten der verschiedenen Isolate, die aus jeweils einem Kalb gewonnen wurden. Die Isolate, welche mildere Klinik und geringere Oozystenausscheidung in den Kälbern auslösten, wiesen zu den verschiedenen Zeitpunkten eine zwei- bis dreifach höhere Exzystierungsrate auf (POZIO et al., 1992).

Die zitierten Studien (FAYER et al., 1985, FAYER und UNGAR, 1986, POZIO et al., 1992) zeigen, dass innerhalb derselben Kryptosporidien-Spezies phänotypische Polymorphismen bestehen, welche für die unterschiedliche Anpasstheit an den Wirt verantwortlich sein könnten. Diese intrinsischen Faktoren verursachen z. B. die Variation der Oozystenausscheidung und die unterschiedliche Ausprägung der Erkrankung im Kalb.

In-vivo-Studien in Menschen (OKHUYSEN et al., 1999) und im Mausmodell (SAYED et al., 2016) bekräftigen die These, dass die Virulenz zwischen Isolaten variiert. Es wurde angenommen, dass eine Abschwächung der Virulenz nach mehrmaliger Passage in derselben Wirtstierspezies auftritt

(OKHUYSEN et al., 1999; SAYED et al., 2016). Dies entspricht eigenen Erfahrungen. In Zellkulturexperimenten muss deshalb nach jeder Passage im Kalb erneut eine Abschätzung der Infektiösität erfolgen. Dieser Gesichtspunkt erklärt in der vorliegenden Arbeit möglicherweise die ermittelte Standardabweichung im MTT-Assay von 18,6 % für den Referenzstamm, welcher in der vorliegenden Arbeit in allen durchgeführten Assays zur Testung der verschiedenen Feldisolate mitgeführt wurde und dafür mehrmals passagiert werden musste, um ausreichend frisches Infektionsmaterial zu generieren.

Eine Überprüfung der Viabilität und Integrität von Zellmonolayern nach Inokulation verschiedener Isolate wurde von WIDMER et al. (1998) mittels der Quantifizierung der apikal vorhandenen LDH und der Messung des elektrischen Widerstandes vorgenommen. Die Autoren stellten in beiden Assays signifikante Unterschiede zwischen den Isolaten fest, die nicht vom jeweiligen Genotyp (fünf *C. hominis*-Isolate, drei *C. parvum*-Isolate) und nicht von der Replikationsgeschwindigkeit des Parasiten abhängig waren (WIDMER et al., 1998).

In der aktuellen Studie wiesen die verschiedenen Feldisolate erhebliche Unterschiede in ihrer Zytotoxigenität auf. Die Evaluation erfolgte 24 h p.i., was eine Entwicklung des Parasiten bis zum frühen Merontenstadium erlaubt. Eine Quantifizierung der Parasitenstadien wurde nicht vorgenommen. Dies könnte zukünftig durch die Anwendung einer quantitativen Real-Time-PCR zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion sinnvoll sein, um festzustellen, ob die Unterschiede im MTT-Assay mit der Replikationsgeschwindigkeit der Isolate in Zusammenhang stehen. WIDMER et al. (1998) stellten 24 h p.i. bei stark zytotoxischen Isolaten den größten Anteil toter Zellen fest und MELE et al. (2004) berichteten, dass infizierte Zellen initial den programmierten Zelltod einleiten. Auch wenn die molekularen Vorgänge, die zum Zelltod führen, nicht im Fokus der vorliegenden Arbeit standen, kann nach WIDMER et al. (1998) und MELE et al. (2004) davon ausgegangen werden, dass der angewendete MTT-Assay einen Zeitraum abbildet, in dem der Parasit noch keine Inhibition der Apoptose verursacht.

In der eigenen Studie wurde ein Zusammenhang zwischen der Zytotoxigenität eines *C. parvum*-Isolates und dem klinischen Status der damit infizierten Kälber ermittelt. Von Betrieben mit Kälbern, welche eine ausgeprägtere Klinik aufwiesen, wurden Kryptosporidien isoliert, deren Infektion *in vitro* zum Absterben eines größeren Anteils an Zellen führte. Die Korrelation zwischen In-vivo- und In-vitro-Daten ist unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Lagerungsdauer der Isolate vor Anwendung des MTT-Assay jedoch vorsichtig zu betrachten. Wurden nur die Feldisolate analysiert, welche innerhalb von vier Wochen im MTT-Assay getestet wurden, stellte sich die Korrelation zwischen In-vivo- und In-vitro-Daten in gleicher Weise dar, jedoch nicht signifikant. In Übereinstimmung mit GÖHRING et al. (2012) ist dies aufgrund der zahlreichen Einflussfaktoren, welche ebenfalls zum Allgemeinbefinden eines Kalbes auf einem landwirtschaftlichen Betrieb beitragen können, nicht verwunderlich. Unter den Feldbedingungen der vorliegenden Arbeit ist die

Feststellung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der *in vitro* ermittelten Zytopathogenität und der Ergebnisse der klinischen Untersuchung *in vivo* sehr schwierig. Um den Phänotyp der isolierten Parasitenstämme *in vivo* besser beschreiben zu können, müsste jedes Isolat in einem Tiermodell unter standardisierten Bedingungen getestet werden. Eine Extrapolation von klinischen Befunden an Mäusen als Labornagermodell auf den eigentlichen Wirt von *C. parvum*, das Kalb, wäre kaum zielführend, weil die Maus nur unter Immunsuppression oder als Knock-out-Züchtung einen geeigneten Wirt für den Parasiten darstellt. Tierversuche sind aus ethischen Gesichtspunkten immer sehr kritisch zu betrachten und erfordern zudem bürokratischen, finanziellen und personellen Aufwand, der im Umfang der vorliegenden Studie (26 Isolate) am Zieltier Kalb nicht umsetzbar gewesen wäre. Insofern bleibt die Interpretation von Zytopathogenitätsdaten mit Blick auf die Kälbergesundheit ein bestenfalls ansatzweise gelöstes Problem, das noch erheblichen Forschungsaufwand erfordert und wahrscheinlich immer Beschränkungen für die Anwendung im Feld unterliegen wird.

Über eine Lagerungsdauer, die noch ohne Verlust der Oozystenviabilität einhergeht, wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert, was auch an methodischen Unterschieden liegen kann. FREIRE-SANTOS et al. (1999) haben gezeigt, dass die Intensität der Infektion in CD-1 Swiss-Mäusen (Oozystenzählung aus Homogenat des Mäusedarms) bereits nach 40 Tagen Lagerung der Oozysten unabhängig von der Temperatur (4 °C, 11 °C, 18 °C) signifikant abnimmt. Im Gegensatz dazu sahen LI et al. (2004) in NMRI-Mäusen qualitativ keine Beeinflussung der Infektiosität von Oozysten durch eine Lagerung in chloriniertem Wasser über acht Wochen. WIDMER et al. (1999) berichteten, dass erst nach elf Wochen Lagerung von Oozysten bei 4 °C unter Zusatz von 1 % Penicillin/Streptomycin geringere Ausscheidungsraten in mit diesen Oozysten infizierten ICR-Mäuse auftraten. FAYER et al. (1998c) kamen zu dem Ergebnis, dass nach 24 Wochen Lagerung der Oozysten bei 5 °C ohne Zusatz von Antibiotika qualitativ und quantitativ keine Abnahme der Infektiosität in BALB/c-Mäusen zu verzeichnen ist und CHEN et al. (2007) beobachteten sogar eine Zunahme der Oozystenausscheidung in Mäusen, wenn die Oozysten über längere Zeit bei 4°C in Wasser gelagert wurden (maximal sieben Monate). JENKINS et al. (2003) untersuchten die Infektiosität von *C. parvum* für HCT-8-Zellen und den Einfluss verschieden langer Lagerung der Oozysten bei 15 °C. Nach sechs Monaten konnten nur noch 3/4 der Zellmonolayer infiziert werden und nach acht Monaten Lagerung war der Parasit nicht mehr infektiös (JENKINS et al., 2003). Anhand dieser Ergebnisse kann zumindest eine qualitative Aussage (infektiös/ nicht infektiös) über den Einfluss verschieden langer Lagerung von Oozysten getroffen werden. Nach JENKINS et al. (2003) sind sechs Monate gelagerte Kryptosporidien-Oozysten für Infektionsversuche in der Zellkultur noch nutzbar. In der vorliegenden Studie ist die Abnahme der Zytopathogenität, als Korrelat der Infektiosität betrachtet, quantifizierbar. Die Oozysten wurden nach der Aufreinigung aus dem Kot in PBS suspendiert und bei 4 °C unter Zusatz von Penicillin/Streptomycin und Amphotericin B gelagert, wie es für Kryptosporidien gängige Praxis ist (PAZIEWSKA-HARRIS et al., 2018). Es zeigte sich, dass länger gelagerte Isolate eine signifikant

geringere Zytopathogenität aufwiesen, was bei zukünftigen Untersuchungen mit Feldisolaten unbedingt berücksichtigt werden muss. Anhand der aktuellen Daten kann geschlossen werden, dass durch die Anwendung der Kombination aus Zellkulturinfektion und MTT-Test eine Aussage über die Qualität von *C. parvum*-Oozysten nach Lagerung bei 4 °C möglich ist.

6.5 Verbreitung von *Gp60*-Subtypen in Sachsen

In humanmedizinischen Studien wurden Zusammenhänge zwischen der Schwere des Durchfalls (CAMA et al., 2007; IQBAL et al., 2011) oder dem Auftreten bestimmter Symptome (Erbrechen, Nasenbluten; CAMA et al., 2008) und Infektionen mit verschiedenen *C. hominis*-Subtypgruppen gefunden. Eine Gegenüberstellung klinischer Daten unter Berücksichtigung der Subtypgruppe unternahm auch DEL CHIERICO et al. (2011) für mit *C. parvum* infizierte AIDS-Patient/en/innen. *C. parvum* der Subtypgruppe IIc sind demnach tendenziell virulenter als IIa-Isolate (DEL CHIERICO et al., 2011). In der vorliegenden Studie wurde dieser Aspekt aufgrund des Studiendesigns (Poolen der Kotproben zu jeweils einem Betriebsisolat) nicht näher analysiert. Ein definiertes In-vivo-Infektionsmodell in der Zieltierart könnte helfen, Zusammenhänge zwischen den genotypischen Eigenschaften der Isolate und deren Virulenz *in vivo* und *in vitro* unter Elimination anderer Einflussfaktoren zu klären. Immerhin konnte für 47 Betriebsisolate eine molekulargenetische Charakterisierung vorgenommen werden. Dafür wurde der am häufigsten verwendete Genlocus, *gp60*, verwendet (KHAN et al., 2018), weil er sich auch innerhalb derselben Kryptosporidien-Spezies in einem für Serin codierenden Trinukleotidbereich als hoch polymorph darstellt (STRONG et al., 2000; LEAV et al., 2002). Es wurde einerseits eine bereits etablierte *Gp60*-nested-PCR durchgeführt (GLABERMAN et al., 2002; ALVES et al., 2003). Des Weiteren wurde ein neues Primerpaar kreiert, um Unterschiede in der Nukleinsäureabfolge des Gens außerhalb des Serin-codierenden Bereiches detektieren zu können. Mit der Amplifikation in nur einer PCR-Reaktion wurde das Risiko der DNA-Kontamination minimiert (ZAHEDI et al., 2017).

In sieben Betrieben konnten mittels Anwendung zweier PCR-Verfahren zwei verschiedenen Subtypen identifiziert werden. Auch in anderen Studien wurde bereits vom Vorkommen verschiedener Subtypen in einer Herde berichtet. In England und Wales wurden nichtidentische Subtypen innerhalb eines Betriebes in separat gehaltenen Gruppen gefunden (SMITH et al., 2014). In weiteren Studien über den Nachweis verschiedener *Gp60*-Subtypen in demselben Betrieb erfolgte kein Aufschluss darüber, wie die mit *C. parvum* infizierten Tiere zueinander gruppiert waren, um das Auftreten des genetischen Polymorphismus erklären zu können (HECKLER et al., 2015; TAYLAN-OZKAN et al., 2016; DÍAZ et al., 2018). RIEUX et al. (2013) vermuteten den Zukauf von Tieren oder den zeitlichen Abstand der

Beprobung als Ursache für die Anwesenheit zweier verschiedener Subtypen in einem französischem Betrieb. In der sächsischen Milchviehhaltung werden die männlichen Kälber häufig im Alter von 14 Tagen als Masttiere verkauft, wodurch eine Verschleppung der Kryptosporidien in andere Bestände durchaus denkbar ist. Die Remontierungsrate der weiblichen Nachzucht ist dagegen üblicherweise sehr hoch. Die Einschleppung eines neuen Kryptosporidienstammes durch Zukauf von Kälbern ist daher in Milchviehbeständen eher unwahrscheinlich. Mit einer individuellen Aufbereitung aller Kotproben für die PCR wären in der vorliegenden Studie genauere Schlussfolgerungen über die Verteilung der verschiedenen Subtypen innerhalb eines Betriebes möglich gewesen. Durch Reanalyse von *C. parvum* positiven Kotproben mittels *Next Generation Sequencing* konnten ZAHEDI et al. (2017) sogar verschiedene *Gp60*-Subtypen in einem Wirt detektieren. Die detaillierte Detektion aller vorhandenen Subtypen stand jedoch nicht im Fokus der aktuellen Arbeit und die Anwendung von *Next Generation Sequencing* hätte den finanziellen Rahmen der Studie gesprengt. Es sollte aus epidemiologischer Sicht ein Überblick über die in Sachsen vorkommenden *Gp60*-Subtypen gegeben werden, welche abgesehen von zwei deutschlandweiten Studien (BROGLIA et al., 2008; GÖHRING et al., 2012) regional noch nicht untersucht wurden. Das Auffinden der auf einem Betrieb vorherrschenden *C. parvum*-Subtypen war trotz der methodischen Limitierungen (Generierung von Betriebsisolaten, *Sanger sequencing*) möglich. Die vorliegende Arbeit leistet damit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Kryptosporidien-Population in Sachsen.

Der Subtyp IIA15G2RI erwies sich, wie auch im gesamten Bundesgebiet (BROGLIA et al., 2008; GÖHRING et al., 2012) und in westlich an Deutschland angrenzenden Ländern (GEURDEN et al., 2007, Belgien; WIELINGA et al., 2008, Niederlande; FOLLET et al., 2011 und RIEUX et al., 2013, Frankreich) als dominierend. Im Gegensatz dazu wurde in Polen IIA17G1R1 am häufigsten nachgewiesen (KAUPKE et al., 2015). Dieser Subtyp konnte in Sachsen nicht gefunden werden, ist jedoch in anderen mitteleuropäischen Ländern in moderater Häufigkeit vorhanden (WIELINGA et al., 2008, Niederlande; BROOK et al., 2009, England/Wales; FOLLET et al., 2011; Frankreich; SMITH et al., 2014, England). In der Tschechischen Republik wurden die Subtypen IIA15G2RI und IIA16G1R1 in jeweils 41 % der untersuchten Betriebe gefunden (KVÁČ et al., 2011). IIA16G1R1 wurde in Sachsen dagegen nur einmal identifiziert und ist im westlichen Europa insgesamt eher selten zu finden (BROGLIA et al., 2008, Deutschland; WIELINGA et al., 2008, Niederlande; FOLLET et al., 2011, Frankreich). In osteuropäischen Ländern (MISIC und ABE, 2007, Serbien; PLUTZER und KANARIS, 2007, Ungarn; IMRE et al., 2001, Rumänien; KAUPKE et al., 2015, Polen) wie auch in Schweden (SILVERLÅS et al., 2013) ist dieser Subtyp dagegen weit verbreitet. Auch in Estland konnte IIA16G1R1 in 15 % der untersuchten Betriebe nachgewiesen werden (SANTORO et al., 2019). Dies lässt den Verdacht zu, dass eine Verbreitung dieses Subtyps von Mitteleuropa über das Baltikum nach Skandinavien erfolgt sein könnte.

Die molekulargenetische Charakterisierung der sächsischen Feldisolate passt insgesamt gut in das epidemiologische Muster in Europa, mit Ausnahme des Subtyps IIAA17G4R1, der nur in der aktuellen Arbeit in Sachsen gefunden wurde. Diese Besonderheit kann aktuell nicht sicher erklärt werden. Für eine geografische Begrenzung gibt es aufgrund der großen Durchseuchungsgefahr der Kryptosporidien keinen überzeugenden Grund. Es ist unklar, ob dieser Subtyp von einem Fokus in Sachsen aus eine weitere Verbreitung finden wird oder, ob der in Sachsen vorherrschende Subtyp (IIAA15G2R1) durch die vermutlich bessere Angepasstheit IIAA17G4R1 im Laufe der Zeit verdrängt wird. Die fast 99 %ige Homologie der generierten Gensequenz dieses Subtyps zu Proben, welche bei bovinen und humanen Fällen von Kryptosporidiose in Australien analysiert wurden (WALDRON et al., 2011a; b) verdeutlicht jedoch, dass dieser Subtyp eine zoonotische Relevanz haben könnte.

Beachtenswerter ist, dass alle in den eigenen Studien gefundenen Feldisolate der Subtypgruppe IIA angehören und damit eine potentielle Infektionsquelle für den Menschen darstellen. Untersuchungen im Zuge eines Kryptosporidioseausbruchs in Schweden haben gezeigt, dass der direkte Kontakt mit infizierten Kälbern durchaus einen möglichen Übertragungsweg darstellt (KINROSS et al., 2015). In dieser Studie wurde in Stuhlproben von Veterinärmedizinstudenten, die nach praktischer Tätigkeit in der ambulatorischen Tierklinik an Durchfall erkrankt waren, und in Kotproben von Kälbern *C. parvum* IIAA16G1R1 identifiziert. Damit kann als sicher gelten, dass Tierärzte und Landwirte einem besonderen Erkrankungsrisiko ausgesetzt sind. Vor diesem Hintergrund muss kritisch hinterfragt werden, ob ein Kontakt insbesondere von Kindern zu jungen Wiederkäuern („Ferien auf dem Bauernhof“, „Streichelzoo“) wünschenswert ist. Häufiger stellen jedoch verunreinigte Wasserquellen die Ursache für humane Kryptosporidioseausbrüche dar (CACCIÒ und CHALMERS, 2016).

WARD et al. (2002) fanden in Süddeutschland neben *C. muris* und *C. hominis* in zahlreichen Proben von Flusswasser, in das konventionell aufbereitetes Abwasser eingeleitet wurde, auch *C. parvum*. In Norddeutschland erwies sich Abwasser vor (100 %) und nach Durchlauf (80 %) einer solchen Aufbereitungsanlage als stark mit *C. parvum* kontaminiert (AJONINA et al., 2012). In Nordrhein-Westfalen fand man in 29 % (STRATHMAN et al., 2016) bzw. 67 % (KISTEMANN et al., 2012) der Flusswasserproben Kryptosporidien. Eine umfangreiche Studie von GALLAS-LINDEMANN et al. (2013) wies den Parasiten in allen Formen von Oberflächenwasser entlang des Rheins und sogar in 3/24 Trinkwasserproben nach. Als Kontaminationsquelle wird unter anderem die Ausbringung von Gülle aus der Tierhaltung vermutet (STRATHMAN et al., 2016). Eine Charakterisierung auf Spezies- oder Subtypenebene wurde in diesen Studien nur teilweise oder gar nicht vorgenommen, was eine Aussage zum Zoonoserisiko erschwert und die Initiierung von Maßnahmen zur Reduktion der Infektionsgefahr für den Menschen behindert. Bisherige Ausbrüche humaner Kryptosporidiose größeren Ausmaßes konnten in Deutschland auf *C. parvum* (keine Subtypisierung, BROCKMANN et al., 2008) und *C. hominis* IIAA9G2 zurückgeführt werden (GERTLER et al., 2015).

Natürlich infizierte Kälber oder auch Lämmer kleiner Wiederkäuer können eine sehr hohe Anzahl von gegen Umwelteinflüsse recht resistenten *C. parvum*-Oozysten ausscheiden. Sie stellen somit direkt über Tierkontakt oder indirekt über eine Kontamination von Oberflächenwasser eine Infektionsquelle für den Menschen dar. Über die Belange der Tiermedizin hinaus, deren Aufgabe der Schutz von Tierbeständen vor Erkrankung und im Fall der Kryptosporidiose insbesondere junger Tiere ist, ist es ebenso wichtig die Epidemiologie der Kryptosporidien unter Berücksichtigung genotypischer und phänotypischer Eigenschaften weiterführend zu erforschen, um Tier und Mensch vor dieser Zoonose besser schützen zu können. Eine höhere Aufmerksamkeit für diese im Allgemeinen eher unterschätzte Parasitose ist von Nöten, und es sollte überlegt werden, wie betriebsspezifische Konzepte für die landwirtschaftliche Nutztierhaltung zur Kontrolle von *C. parvum* im Sinne eines One-Health-Ansatzes erarbeitet werden können. Die Integration molekularbiologischer Methoden zur Speziesdifferenzierung und Subtypisierung in die routinemäßige Untersuchung diagnostischer Labore kann helfen abzuschätzen, ob die Präsenz von Kryptosporidien in einer Herde mit besonderen Risiken assoziiert ist. In-vitro-Testverfahren sollten auf ihre Tauglichkeit als Werkzeuge zur Charakterisierung zytopathogener Eigenschaften weiter untersucht und gegebenenfalls fortentwickelt werden. Auf dieser Basis wäre es vorstellbar, dass zukünftig im Labor Aussagen zur Virulenz entweder im Zellkulturversuch oder idealerweise durch Subtypisierung möglich wären. Unbenommen davon ist die Kryptosporidiose eine multifaktorielle Erkrankung, die zahlreichen Einflüssen in der Tierhaltung unterliegt, sodass eine präzisere Methodik den gesamtheitlichen Blick auf die Diagnostik und Klinik der Kryptosporidiose nicht ersetzen kann. Zumindest für die Erforschung möglicher Virulenzfaktoren ist die Evaluation der Zytopathogenität, auch wenn sie sich nicht für die Routinediagnostik eignen sollte, von potentiell erheblicher Bedeutung.

7 Zusammenfassung

Ivette Holzhausen

Kryptosporidiose der Kälber: Studien zu Prävalenz, Virulenz und Inaktivierung des Erregers

Institut für Parasitologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

eingereicht im August 2019

56 Seiten, 2 Tabellen, 336 Literaturstellen

Schlüsselwörter: *Cryptosporidium parvum*, Inaktivierung, Kalb, *Gp60*-Subtypen, Zytopathogenität

Einleitung: Die Kryptosporidiose der Kälber wird zumeist durch die Spezies *C. parvum* verursacht, einem ubiquitär verbreiteten Parasiten mit zoonotischem Potential. Die Infektion geht insbesondere in den ersten Lebenswochen mit wässrigem Durchfall einher, was in der Nutztierhaltung durch eine erhöhte Sterblichkeit enorme wirtschaftliche Verluste bedeuten kann. Neben einer Vielzahl anderer Einflussfaktoren trägt der Erreger mit unterschiedlicher Virulenz zur Ausprägung der Klinik bei. Aufgrund limitierter kausaler Therapeutika ist das Desinfektionsmanagement auf einem Kälber haltenden Betrieb bei der Bekämpfung entscheidend. Epidemiologische Studien sind essentiell, um die eher unterschätzte Parasitose im Sinne eines One-Health-Ansatzes mehr in den Fokus der Aufmerksamkeit zu rücken.

Ziele der Untersuchungen: Mit der Testung verschiedener chemischer Substanzen und UV-Bestrahlung auf die Wirksamkeit gegen *C. parvum*-Oozysten sollten mögliche Alternativen zu den antiprotozoären Desinfektionsmitteln für das Labor aufgezeigt werden. Anhand von Sequenzanalysen des *Gp60*-Genlokus wurden *C. parvum*-Feldisolate von Kälbern aus sächsischen Milchviehbetrieben molekulargenetisch charakterisiert, um einen Überblick über die im Untersuchungsgebiet verbreiteten Subtypen generieren zu können. Diese Feldisolate wurden außerdem *in vitro* unter standardisierten Laborbedingungen in humanen Adenokarzinomzellen (HCT-8) auf Zytopathogenität getestet, um möglicherweise auf die Erregervirulenz *in vivo* rückschließen zu können.

Tiere, Material und Methoden: *C. parvum*-Oozysten eines Laborstammes wurden in denaturiertem Ethanol, Ethanol (70 %, 100 %), Wasserstoffperoxid (H₂O₂, 3 %, 10 %) oder Natriumhypochlorit (NaOCl, 1,5 %, 3 %, 6 %) über 30 min, 2 h, 4 h, 12 h oder 24 h in Suspension inkubiert oder auf einem Keimträger über 10 min, 20 min und 30 min einer UV-C-Strahlung ausgesetzt. Anschließend wurden mit diesen Oozysten HCT-8-Zellen infiziert und die Infektiosität mittels Real-Time-PCR quantifiziert.

In einer epidemiologischen Studie wurden bis zu 13 Kälber aus 61 Milchviehbetrieben klinisch untersucht. Entnommene Kotproben wurden nach ihrer Konsistenz gescort und semiquantitativ mittels Heine-Färbung auf *Cryptosporidium* spp. untersucht. Gewonnene Feldisolate wurden *in vitro* zur Infektion von HCT-8-Zellmonolayern verwendet, um deren Zytopathogenität mit Hilfe eines Zellviabilitätsassay (MTT-Assay) zu ermitteln. Nicht infizierte Zellmonolayer dienten als Negativkontrolle. Zur genetischen Subtypisierung der Feldisolate erfolgten Sequenzanalysen des *Gp60*-Genlokus mittels Amplifizierung in zwei unterschiedlichen PCR-Verfahren.

Alle Zellkulturexperimente wurden in Triplikaten durchgeführt und der Mittelwert (Inaktivierungsstudien) bzw. der Median (Zellviabilität) errechnet. Die ermittelten Daten wurden auf Normalverteilung getestet (Shapiro-Wilk-Test). Gruppenvergleiche erfolgten mit dem Mann-Whitney-*U*-Test (keine Normalverteilung) bzw. dem *t*-Test (Normalverteilung). Korrelationsanalysen wurden mit dem Pearson-Korrelationskoeffizienten durchgeführt.

Ergebnisse: Die Anwendung von 10 %igem H₂O₂ mit einer Einwirkzeit von mindestens 12 h sowie die Inkubation in NaOCl (3 % und 6 %) über 12 h führte zu einer fast vollständigen Inaktivierung (> 99 %) der *C. parvum*-Oozysten. Diese Effektivität wurde auch mit der UV-Strahlung über 30 min (100 mJ/cm²) erreicht.

89 % (455/512) der beprobten Kälber wurden positiv auf *Cryptosporidium* spp. getestet und in jedem Betrieb wurde mindestens ein Ausscheider detektiert. Infizierte Tiere zeigten signifikant häufiger Durchfall als negativ Getestete. Die Subtypisierung war für 47 Feldisolate erfolgreich. IIAA15G2R1 wurde in 66 % der Betriebe gefunden, IIAA16G3R1 in 13 %. Acht weitere *Gp60*-Subtypen der Gruppe IIA wurden weniger häufig (< 8,5 %) nachgewiesen, der Subtyp IIAA17G4R1 dabei erstmals in Deutschland.

26 Feldisolate konnten *in vitro* auf ihre Zytopathogenität getestet werden. Es wurden Werte zwischen 17,7 % (± 5,1 %) und 99,5 % (± 7,1 %) lebender Zellen nach Infektion ermittelt. Die Feldisolate wurden in drei Zytopathogenitätskategorien gruppiert. Es wurde eine signifikante Korrelation zwischen In vitro- und In-vivo-Daten ermittelt. Außerdem hatte die Lagerungsdauer der Oozysten signifikanten Einfluss auf die Zytopathogenität.

Schlussfolgerungen: UV-C-Strahlen (100 mJ/cm²) und 10 %iger H₂O₂ sind bei Einhaltung entsprechender Einwirkzeiten geeignet *C. parvum*-Oozysten effizient zu inaktivieren. Die Studienergebnisse bestätigen in einem regional eingeschränkten Rahmen, dass *C. parvum* als Primärpathogen entscheidend am Durchfallgeschehen junger Kälber beteiligt ist. Alle in Sachsen detektierten Subtypen weisen ein zoonotisches Potential auf. Durch die Anwendung des MTT-Assay ist eine Aussage über die Qualität von *C. parvum*-Oozysten nach Lagerung bei 4 °C möglich. Zur Eignung als diagnostisches Tool bedarf es weiterer Untersuchungen.

8 Summary

Ivette Holzhausen

Bovine cryptosporidiosis: studies on prevalence, Virulence and inactivation of the pathogen

Institute of Parasitology, Faculty of Veterinary medicine, University of Leipzig

submitted in August 2019

56 pages, 2 tables, 336 references

key words: *Cryptosporidium parvum*, inactivation, calf, *gp60* subtypes, cytopathogenicity

Introduction: Bovine cryptosporidiosis is mostly caused by the species *C. parvum*, a ubiquitously spread parasite with zoonotic potential. The infection is associated with watery diarrhoea, especially in the first weeks of life, which can lead to enormous economic losses in livestock farming due to increased mortality. In addition to a multitude of other influencing factors, the pathogen with variation in virulence contributes directly to the clinical course of the disease. Due to limited causal therapeutics, disinfection management on a calf holding is crucial to control the infection. Epidemiological studies are essential in order to focus more on the rather underestimated parasitosis in the sense of a one-health approach.

Aims of the investigations: By testing various chemical substances and UV irradiation for efficacy against *C. parvum* oocysts, possible alternatives to antiprotozoal disinfectants for the laboratory were to be identified. Using sequence analyses of the *gp60* gene locus, *C. parvum* field isolates of calves from Saxon dairy farms were molecularly characterized in order to generate an overview of the common subtypes in the study area. These field isolates were also tested for cytopathogenicity *in vitro* under standardized laboratory conditions in human adenocarcinoma cells (HCT-8) in order to possibly deduce to the pathogen's virulence *in vivo*.

Animals, materials and methods: *C. parvum* oocysts of a laboratory strain were incubated in suspension in denatured ethanol, ethanol (70 %, 100 %), hydrogen peroxide (H₂O₂, 3 %, 10 %) or sodium hypochlorite (NaOCl, 1.5 %, 3 %, 6 %) for 30 min, 2 h, 4 h, 12 h or 24 h. Furthermore, *C. parvum* oocysts were exposed to UV-C radiation for 10 min, 20 min and 30 min on a germ carrier. Subsequently, HCT-8 cells were infected with these oocysts and the infectivity was quantified by real-time PCR.

In an epidemiological survey, up to 13 calves from 61 dairy farms were clinically examined. Faecal samples were scored for consistency and semi-quantitatively examined for *Cryptosporidium* spp. by Heine staining. Field isolates obtained were used *in vitro* for the

8 Summary

infection of HCT-8 cell monolayers to determine their cytopathogenicity using a cell viability assay (MTT assay). Non-infected cell monolayers served as negative controls. A *C. parvum* laboratory strain was tested alongside in every assay. For genetic subtyping of the field isolates, sequence analyses of the *gp60* gene locus were performed after amplification by two different PCR methods.

All cell culture experiments were performed in triplicates and means (inactivation studies) or medians (cell viability values) were calculated. The data were tested for normal distribution (Shapiro-Wilk test). Group comparisons were made with the Mann-Whitney *U* test (non-normally distributed data) or the student's *t*-test (normally distributed data). Correlation analyses were performed using the Pearson's correlation coefficient.

Results: The application of 10 % H₂O₂ with an exposure time of at least 2 h and the incubation in NaOCl (3 % and 6 %) over 12 h led to an almost complete inactivation (> 99 %) of *C. parvum* oocysts. This effectiveness was also achieved by UV irradiation over 30 min (100 mJ/cm²).

89 % (455/512) of the calves sampled were tested positive for *Cryptosporidium* spp. and at least one oocyst excreter was detected in each farm. Infected animals suffered significantly more from diarrhoea than uninfected. Subtyping was successful for 47 field isolates. IIaA15G2R1 was found in 66 % of the farms, IIaA16G3R1 in 13 %. Eight further *gp60* subtypes of group IIa were found less frequently (< 8.5 %). This is the first detection of subtype IIaA17G4R1 in Germany.

27 field isolates could be tested *in vitro* for their cytopathogenicity. Values between 17.7 % (± 5.1 %) and 99.5 % (± 7.1 %) of living cells after infection were determined. The field isolates were grouped into three cytopathogenicity categories. A significant correlation between *in vitro* and *in vivo* data was found. Furthermore, the storage time of the oocysts had a significant influence on cytopathogenicity.

Conclusions: UV-C irradiation (100 mJ/cm²), 10 % H₂O₂ and NaClO (3 %, 6 %) are suitable for efficiently inactivating *C. parvum* oocysts when the appropriate exposure times are observed.

The study results confirm, within a limited regional scope, that *C. parvum* as primary pathogen is decisively involved in the event of calf diarrhoea and that the parasite has an ubiquitous distribution. All subtypes detected in Saxony have a zoonotic potential. The use of MTT assay allows a statement to be made about the quality of *C. parvum* oocysts after storage at 4 °C. Further investigations are required to make the MTT assay suitable as a diagnostic tool.

9 Literaturverzeichnis

- Abeledo-Lameiro MJ, Ares-Mazás E, Gómez-Couso H. Use of ultrasound irradiation to inactivate *Cryptosporidium parvum* oocysts in effluents from municipal wastewater treatment plants. *Ultrason Sonochem.* 2018; 48:118–126.
- Åberg R, Sjöman M, Hemminki K, Pirnes A, Räsänen S, Kalanti A, Pohjanvirta T, Caccio SM, Pihlajasaari A, Toikkanen S, Huusko S, Rimhanen-Finne R. *Cryptosporidium parvum* Caused a Large Outbreak Linked to Frisée Salad in Finland, 2012. *Zoonoses Public Health.* 2015; 62(8):618–624.
- Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S, Abrahante JE, Zhu G, Lancto CA, Deng M, Liu C, Widmer G, Tzipori S, Buck GA, Xu P, Bankier AT, Dear PH, Konfortov BA, Spriggs HF, Iyer L, Anantharaman V, Aravind L, Kapur V. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science.* 2004; 304(5669):441–445.
- Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S, Abrahante JE, Zhu G, Lancto CA, Deng M, Liu C, Widmer G, Tzipori S, Buck GA, Xu P, Bankier AT, Dear PH, Konfortov BA, Spriggs HF, Iyer L, Anantharaman V, Aravind L, Kapur V. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science.* 2004; 304(5669):441–445.
- Adams RB, Guerrant RL, Zu S, Fang G, Roche JK. *Cryptosporidium parvum* infection of intestinal epithelium: morphologic and functional studies in an in vitro model. *J Infect Dis.* 1994; 169(1):170–177.
- Ajonina C, Buzie C, Ajonina IU, Basner A, Reinhardt H, Gulyas H, Liebau E, Otterpohl R. Occurrence of *Cryptosporidium* in a wastewater treatment plant in North Germany. *J Toxicol Environ Health A.* 2012; 75(22-23):1351–1358.
- Aldeyarbi HM, Karanis P. The fine structure of sexual stage development and sporogony of *Cryptosporidium parvum* in cell-free culture. *Parasitology.* 2016; 143(6):749–761.
- Allal AS, Kähne T, Reverdin AK, Lippert H, Schlegel W, Reymond M. Radioresistance-related proteins in rectal cancer. *Proteomics.* 2004; 4(8):2261–2269.
- Alonso JL, Amorós I, Guy RA. Quantification of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in wastewater using propidium monoazide quantitative real-time PCR. *Parasitol Res.* 2014; 113(7):2671–2678.
- Alum A, Rubino JR, Ijaz MK. Comparison of molecular markers for determining the viability and infectivity of *Cryptosporidium* oocysts and validation of molecular methods against animal infectivity assay. *Int J Infect Dis.* 2011; 15(3):197–200.

- Alves M, Xiao L, Antunes F, Matos O. Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. *Parasitol Res.* 2006; 99(3):287–292.
- Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, Antunes F. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(6):2744–2747.
- Anderson BC. Moist heat inactivation of *Cryptosporidium* sp. *Am J Public Health.* 1985; 75(12):1433–1434.
- Argenzio RA, Lecce J, Powell DW. Prostanoids inhibit intestinal NaCl absorption in experimental porcine cryptosporidiosis. *Gastroenterology.* 1993; 104(2):440–447.
- Arrowood MJ. In vitro cultivation of *Cryptosporidium* species. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(3):390–400.
- Asadpour M, Namazi F, Razavi SM, Nazifi S. Comparative efficacy of curcumin and paromomycin against *Cryptosporidium parvum* infection in a BALB/c model. *Vet Parasitol.* 2018; 250:7–14.
- Ashokkumar M, Vu T, Grieser F, Weerawardena A, Anderson N, Pilkington N, Dixon DR. Ultrasonic treatment of *Cryptosporidium* oocysts. *Water Sci Technol.* 2003; 47(3):173–177.
- Askari N, Shayan P, Mokhber-Dezfouli MR, Ebrahimzadeh E, Lotfollahzadeh S, Rostami A, Amininia N, Ragh MJ. Evaluation of recombinant P23 protein as a vaccine for passive immunization of newborn calves against *Cryptosporidium parvum*. *Parasite Immunol.* 2016; 38(5):282–289.
- Bajszár G, Dekonenko A. Stress-induced Hsp70 gene expression and inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts by chlorine-based oxidants. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76(6):1732–1739.
- Barbee SL, Weber DJ, Sobsey MD, Rutala WA. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity by disinfection and sterilization processes. *Gastrointest Endosc.* 1999; 49(5):605–611.
- Barta JR, Thompson RCA. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends Parasitol.* 2006; 22(10):463–468.
- Bartels CJM, Holzhauer M, Jorritsma R, Swart, Wim A J M, Lam, Theo J G M. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Prev Vet Med.* 2010; 93(2-3):162–169.
- Baskin GB. Cryptosporidiosis of the Conjunctiva in SIV-Infected Rhesus Monkeys. *J Parasitol.* 1996; 82(4):630.

- Belosevic M, Craik SA, Stafford JL, Neumann NF, Kruithof J, Smith DW. Studies on the resistance/reactivation of *Giardia muris* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts exposed to medium-pressure ultraviolet radiation. *FEMS Microbiol Lett.* 2001; 204(1):197–203.
- Benamrouz S, Guyot K, Gazzola S, Mouray A, Chassat T, Delaire B, Chabé M, Gosset P, Viscogliosi E, Dei-Cas E, Creusy C, Conseil V, Certad G. *Cryptosporidium parvum* infection in SCID mice infected with only one oocyst: qPCR assessment of parasite replication in tissues and development of digestive cancer. *PLoS One.* 2012; 7(12):51232.
- Biswas K, Craik S, Smith DW, Belosevic M. Synergistic inactivation of *Cryptosporidium parvum* using ozone followed by monochloramine in two natural waters. *Water Res.* 2005; 39(14):3167–3176.
- Björkman C, Lindström L, Oweson C, Ahola H, Troell K, Axén C. *Cryptosporidium* infections in suckler herd beef calves. *Parasitology.* 2015; 142(8):1108–1114.
- Björkman C, Svensson C, Christensson B, de Verdier K. *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in Calf Diarrhoea in Sweden. *Acta Vet Scand.* 2003; 44(3):145.
- Black EK, Finch GR, Taghi-Kilani R, Belosevic M. Comparison of assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts viability after chemical disinfection. *FEMS Microbiol Lett.* 1996; 135(2-3):187–189.
- Blagburn BL, Drain KL, Land TM, Kinard RG, Moore PH, Lindsay DS, Patrick DA, Boykin DW, Tidwell RR. Comparative efficacy evaluation of dicationic carbazole compounds, nitazoxanide, and paromomycin against *Cryptosporidium parvum* infections in a neonatal mouse model. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(11):2877–2882.
- Brescia CC, Griffin SM, Ware MW, Varughese EA, Egorov AI, Villegas EN. *Cryptosporidium propidium* monoazide-PCR, a molecular biology-based technique for genotyping of viable *Cryptosporidium* oocysts. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(21):6856–6863.
- Brockmann SO, Dreweck C, Wagner-Wiening C, Hagen RM, Kimmig P, Petry F, Jakobi V. Serological and epidemiological analysis of an outbreak of gastroenteritis among military recruits in Germany caused by *Cryptosporidium parvum*. *Infection.* 2008; 36(5):450–457.
- Broglia A, Reckinger S, Cacció SM, Nöckler K. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. *Vet Parasitol.* 2008; 154(1-2):8–13.
- Brook EJ, Anthony Hart C, French NP, Christley RM. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. *Vet J.* 2009; 179(3):378–382.
- Bukhari Z, Marshall MM, Korich DG, Fricker CR, Smith HV, Rosen J, Clancy JL. Comparison of *Cryptosporidium parvum* viability and infectivity assays following ozone treatment of oocysts. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(7):2972–2980.

- Bukhari Z, Hargy TM, Bolton JR, Dussert B, Clancy JL. Medium-pressure UV for oocyst inactivation. *J Am Water Works Assoc.* 1999; 91(3):86–94.
- Burton AJ, Nydam DV, Jones G, Zambriski JA, Linden TC, Cox G, Davis R, Brown A, Bowman DD. Antibody responses following administration of a *Cryptosporidium parvum* rCP15/60 vaccine to pregnant cattle. *Vet Parasitol.* 2011; 175(1-2):178–181.
- Cacciò SM, Chalmers RM. Human cryptosporidiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2016; 22(6):471–480.
- Cama VA, Bern C, Roberts J, Cabrera L, Sterling CR, Ortega Y, Gilman RH, Xiao L. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14(10):1567–1574.
- Cama VA, Ross JM, Crawford S, Kawai V, Chavez-Valdez R, Vargas D, Vivar A, Ticona E, Navincopa M, Williamson J, Ortega Y, Gilman RH, Bern C, Xiao L. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *J Infect Dis.* 2007; 196(5):684–691.
- Campbell AT, Robertson LJ, Smith HV. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. *Appl Environ Microbiol.* 1992; 58(11):3488–3493.
- Carreno RA, Martin DS, Barta JR. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol Res.* 1999; 85(11):899–904.
- Carreno RA, Pokorny NJ, Weir SC, Lee H, Trevors JT. Decrease in *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in vitro by using the membrane filter dissolution method for recovering oocysts from water samples. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(7):3309–3313.
- Casemore DP, Armstrong M, Jackson B. Screening for *Cryptosporidium* in stools. *Lancet.* 1984; 8379(1):734–735.
- Casteel MJ, Sobsey MD, Arrowood MJ. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and other microbes in water and wastewater by electrochemically generated mixed oxidants. *Water Sci Technol.* 2000; 41(7):127–134.
- Castro-Hermida JA, Pors I, Méndez-Hermida F, Ares-Mazás E, Chartier C. Evaluation of two commercial disinfectants on the viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Vet J.* 2006; 171(2):340–345.
- Castro-Hermida JA, García-Presedo I, Almeida A, González-Warleta M, Correia Da Costa, José Manuel, Mezo M. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in two areas of Galicia (NW Spain). *Sci Total Environ.* 2011; 409(13):2451–2459.

- Cavalier-Smith T. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *Eur J Protistol.* 2014; 50(5):472–495.
- Chalmers RM, Katzer F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends Parasitol.* 2013; 29(5):237–251.
- Chalmers RM, Pérez-Cordón G, Cacció SM, Klotz C, Robertson LJ. *Cryptosporidium* genotyping in Europe: The current status and processes for a harmonised multi-locus genotyping scheme. *Exp Parasitol.* 2018; 191:25–30.
- Chapman HD, Jeffers TK, Williams RB. Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. *Poult Sci.* 2010; 89(9):1788–1801.
- Chartier C, Rieux A, Delafosse A, Lehebel A, Paraud C. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fresh calf faeces: characteristics of two simple tests and evaluation of a semi-quantitative approach. *Vet J.* 2013; 198(1):148–152.
- Chen F, Huang K, Qin S, Zhao Y, Pan C. Comparison of viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in potassium dichromate solution and chlorinated tap water. *Vet Parasitol.* 2007; 150(1-2):13–17.
- Chen XM, Gores GJ, Paya CV, LaRusso NF. *Cryptosporidium parvum* induces apoptosis in biliary epithelia by a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *Am J Physiol.* 1999; 277(3):G599-608.
- Chen XM, Levine SA, Splinter PL, Tietz PS, Ganong AL, Jobin C, Gores GJ, Paya CV, LaRusso NF. *Cryptosporidium parvum* activates nuclear factor κ B in biliary epithelia preventing epithelial cell apoptosis. *Gastroenterology.* 2001; 120(7):1774–1783.
- Chen XM, Levine SA, Tietz P, Krueger E, McNiven MA, Jefferson DM, Mahle M, LaRusso NF. *Cryptosporidium parvum* is cytopathic for cultured human biliary epithelia via an apoptotic mechanism. *Hepatology.* 1998; 28(4):906–913.
- Cho Y, Han J, Wang C, Cooper V, Schwartz K, Engelken T, Yoon K. Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. *Vet Microbiol.* 2013; 166(3-4):375–385.
- Clancy JL, Bukhari Z, Hargy TM, Bolton JR, Dussert BW, Marshall MM. Using UV to inactivate *Cryptosporidium*. *J Am Water Works Assoc.* 2000; 92(9):97–104.
- Clancy JL, Marshall MM, Hargy TM, Korich DG. Susceptibility of five strains of *Cryptosporidium parvum* oocysts to UV light. *J Am Water Works Assoc.* 2004; 96(3):88–93.
- Collins MV, Flick GJ, Smith SA, Fayer R, Croonenberghs R, O'Keefe S, Lindsay DS. The effect of high-pressure processing on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered

from experimentally exposed Eastern oysters (*Crassostrea virginica*). J Eukaryot Microbiol. 2005a; 52(6):500–504.

Collins MV, Flick GJ, Smith SA, Fayer R, Rubendall E, Lindsay DS. The effects of E-beam irradiation and microwave energy on Eastern Oysters (*Crassostrea virginica*) experimentally infected with *Cryptosporidium parvum*. J Eukaryot Microbiol. 2005b; 52(6):484–488.

Connelly SJ, Wolyniak EA, Williamson CE, Jellison KL. Artificial UV-B and Solar Radiation Reduce in Vitro Infectivity of the Human Pathogen *Cryptosporidium parvum*. Environ. Sci. Technol. 2007; 41(20):7101–7106.

Corona-Vasquez B, Samuelson A, Rennecker JL, Mariñas BJ. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone and free chlorine. Water Res. 2002; 36(16):4053–4063.

Crissman HA, Steinkamp JA. Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. J Cell Biol. 1973; 59(3):766–771.

Current WL, Haynes TB. Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. Science. 1984; 224(4649):603–605.

Current WL, Long PL. Development of human and calf *Cryptosporidium* in chicken embryos. J Infect Dis. 1983; 148(6):1108–1113.

Current WL, Reese NC. A Comparison of Endogenous Development of Three Isolates of *Cryptosporidium* in Suckling Mice. J Protozool. 1986; 33(1):98–108.

Dauguschies A, Böse R, Marx J, Teich K, Friedhoff K. Development and application of a standardized assay for chemical disinfection of coccidia oocysts. Vet Parasitol. 2002; 103(4):299–308.

Dawson DJ, Samuel CM, Scrannage V, Atherton CJ. Survival of *Cryptosporidium* species in environments relevant to foods and beverages. J Appl Microbiol. 2004; 96(6):1222–1229.

De Graaf DC, Vanopdenbosch E, Ortega-Mora LM, Abbassi H, Peeters JE. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. Int J Parasitol. 1999; 29(8):1269–1287.

Del Chierico F, Onori M, Di Bella S, Bordi E, Petrosillo N, Menichella D, Cacciò SM, Callea F, Putignani L. Cases of cryptosporidiosis co-infections in AIDS patients: a correlation between clinical presentation and GP60 subgenotype lineages from aged formalin-fixed stool samples. Ann Trop Med Parasitol. 2011; 105(5):339–349.

Delaunay A, Gargala G, Li X, Favennec L, Ballet JJ. Quantitative flow cytometric evaluation of maximal *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in a neonate mouse model. Appl Environ Microbiol. 2000; 66(10):4315–4317.

- Delling C, Lendner M, Müller U, Dauschies A. Improvement of *in vitro* evaluation of chemical disinfectants for efficacy on *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Vet Parasitol.* 2017; 245:5–13.
- Deng MQ, Cliver DO. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cider by flash pasteurization. *J Food Prot.* 2001; 64(4):523–527.
- Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG). Methoden der Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln für die Tierhaltung, V. Tierhaltung Parasitenwirksamkeit, Spalte 8a/8b. 2019.
- Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches (DVGW). Information des DVGW-Projektkreises „Desinfektion“ des Technischen Komitees „Wasseraufbereitung“ vom April 2012 zur Sicherung eines regelkonformen Betriebs von UV-Desinfektionsgeräten nach DVGW-Arbeitsblatt W294. 2012.
- Díaz P, Hadfield SJ, Quílez J, Soilán M, López C, Panadero R, Díez-Baños P, Morrondo P, Chalmers RM. Assessment of three methods for multilocus fragment typing of *Cryptosporidium parvum* from domestic ruminants in north west Spain. *Vet Parasitol.* 2012; 186(3-4):188–195.
- Díaz P, Varcasia A, Pipia AP, Tamponi C, Sanna G, Prieto A, Ruiu A, Spissu P, Díez-Baños P, Morrondo P, Scala A. Molecular characterisation and risk factor analysis of *Cryptosporidium* spp. in calves from Italy. *Parasitol Res.* 2018; 117(10):3081–3090.
- Díaz P, Quílez J, Chalmers RM, Panadero R, López C, Sánchez-Acedo C, Morrondo P, Díez-Baños P. Genotype and subtype analysis of *Cryptosporidium* isolates from calves and lambs in Galicia (NW Spain). *Parasitology.* 2010; 137(8):1187–1193.
- Dresely I, Dauschies A, Lendner M. Establishment of a germ carrier assay to assess disinfectant efficacy against oocysts of coccidian parasites. *Parasitol Res.* 2015; 114(1):273–281.
- Dubey JP, Jenkins M, Thayer DW. Irradiation Killing of *Toxoplasma gondii* Oocysts. *J Eukaryot Microbiol.* 1996; 43(5):123S-123S.
- Duhain, GLMC, Minnaar A, Buys EM. Effect of chlorine, blanching, freezing, and microwave heating on *Cryptosporidium parvum* viability inoculated on green peppers. *J Food Prot.* 2012; 75(5):936–941.
- Elliott DA, Clark DP. Host cell fate on *Cryptosporidium parvum* egress from MDCK cells. *Infect Immun.* 2003; 71(9):5422–5426.
- Entrala E, Rueda-Rubio M, Janssen D, Mascaró C. Influence of hydrogen peroxide on acid-fast staining of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Int J Parasitol.* 1995; 25(12):1473–1477.

- Entrala E, Garin YJF, Meneceur P, Hayat M, Scherpereel G, Savin C, Féliers C, Derouin F. Pilot-scale evaluation of UV reactors' efficacy against in vitro infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. FEMS Immunol Med Microbiol. 2007; 51(3):555–561.
- Erickson MC, Ortega YR. Inactivation of protozoan parasites in food, water, and environmental systems. J Food Prot. 2006; 69(11):2786–2808.
- Fayer R. Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. Appl Environ Microbiol. 1994; 60(8):2732–2735.
- Fayer R. Effect of sodium hypochlorite exposure on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts for neonatal BALB/c mice. Appl Environ Microbiol. 1995; 61(2):844–846.
- Fayer R, Ellis W. Paromomycin is effective as prophylaxis for cryptosporidiosis in dairy calves. J Parasitol. 1993; 79(5):771–774.
- Fayer R, Ernst JV, Miller RG, Leek RG. Factors contributing to clinical illness in calves experimentally infected with a bovine isolate of *Cryptosporidium*. Proc. Helminthol. Soc Wash. 1985; 52(1):64–70.
- Fayer R, Gasbarre L, Pasquali P, Canals A, Almeria S, Zarlenga D. *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. Int J Parasitol. 1998a; 28(1):49–56.
- Fayer R, Graczyk TK, Cranfield MR, Trout JM. Gaseous disinfection of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Appl Environ Microbiol. 1996; 62(10):3908–3909.
- Fayer R, Graczyk TK, Lewis EJ, Trout JM, Farley CA. Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. Appl Environ Microbiol. 1998b; 64(3):1070–1074.
- Fayer R, Leek RG. The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature, and time on in vitro excystation of *Cryptosporidium*. J Protozool. 1984; 31(4):567–569.
- Fayer R, Nerad T. Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Appl Environ Microbiol. 1996; 62(4):1431–1433.
- Fayer R, Trout JM, Jenkins MC. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts Stored in Water at Environmental Temperatures. J Parasitol. 1998; 84(6):1165.
- Fayer R, Ungar BL. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. Microbiol Rev. 1986; 50(4):458–483.
- Fayer R, Santín M, Trout JM. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). Vet Parasitol. 2008; 156(3-4):191–198.

- Fayer R, Santín M, Trout JM, Greiner E. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Vet Parasitol.* 2006; 135(2):105–112.
- Fayer R, Santín M, Xiao L. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J Parasitol.* 2005; 91(3):624–629.
- Feng Y, Ortega Y, He G, Das P, Xu M, Zhang X, Fayer R, Gatei W, Cama V, Xiao L. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Vet Parasitol.* 2007; 144(1-2):1–9.
- Feng Y, Torres E, Li N, Wang L, Bowman D, Xiao L. Population genetic characterisation of dominant *Cryptosporidium parvum* subtype IIaA15G2R1. *Int J Parasitol.* 2013; 43(14):1141–1147.
- Feng Y, Wang L, Duan L, Gomez-Puerta LA, Zhang L, Zhao X, Hu J, Zhang N, Xiao L. Extended outbreak of cryptosporidiosis in a pediatric hospital, China. *Emerging Infect Dis.* 2012; 18(2):312–314.
- Finch GR, Black EK, Gyürék L, Belosevic M. Ozone inactivation of *Cryptosporidium parvum* in demand-free phosphate buffer determined by in vitro excystation and animal infectivity. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59(12):4203–4210.
- Finch GR, Haas CN, Oppenheimer JA, Gordon G, Trussell RR. Design Criteria for Inactivation of *Cryptosporidium* by Ozone in Drinking Water. *Ozone Sc Eng.* 2001; 23(4):259–284.
- Follet J, Guyot K, Leruste H, Follet-Dumoulin A, Hammouma-Ghelboun O, Certad G, Dei-Cas E, Halama P. *Cryptosporidium* infection in a veal calf cohort in France: molecular characterization of species in a longitudinal study. *Vet Res.* 2011; 42:116.
- Foster DM, Stauffer SH, Stone MR, Gookin JL. Proteasome inhibition of pathologic shedding of enterocytes to defend barrier function requires X-linked inhibitor of apoptosis protein and nuclear factor κ B. *Gastroenterology.* 2012; 143(1):133–144.
- Freire-Santos F, Oteiza-López AM, Vergara-Castiblanco CA, Ares-Mazás ME. Effect of salinity, temperature and storage time on mouse experimental infection by *Cryptosporidium parvum*. *Vet Parasitol.* 1999; 87(1):1–7.
- Fujino T, Matsui T, Kobayashi F, Haruki K, Yoshino Y, Kajima J, Tsuji M. The effect of heating against *Cryptosporidium* oocysts. *J Vet Med Sci.* 2002; 64(3):199–200.
- Gallas-Lindemann C, Sotiriadou I, Plutzer J, Karanis P. Prevalence and distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater and the surface, drinking and ground waters in the Lower Rhine, Germany. *Epidemiol Infect.* 2013; 141(1):9–21.

- Garcés-Sanchez G, Wilderer PA, Horn H, Munch J, Lebuhn M. Assessment of the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts with the induction ratio of *hsp70* mRNA production in manure. *J Microbiol Methods*. 2013; 94(3):280–289.
- Garro CJ, Morici GE, Utgés ME, Tomazic ML, Schnittger L. Prevalence and risk factors for shedding of *Cryptosporidium* spp. oocysts in dairy calves of Buenos Aires Province, Argentina. *Parasite Epidemiol Control*. 2016; 1(2):36–41.
- Garvey M, Farrell H, Cormican M, Rowan N. Investigations of the relationship between use of *in vitro* cell culture-quantitative PCR and a mouse-based bioassay for evaluating critical factors affecting the disinfection performance of pulsed UV light for treating *Cryptosporidium parvum* oocysts in saline. *J Microbio Methods*. 2010; 80(3):267–273.
- Gertler M, Dürr M, Renner P, Poppert S, Askar M, Breidenbach J, Frank C, Preußel K, Schielke A, Werber D, Chalmers R, Robinson G, Feuerpfeil I, Tannich E, Gröger C, Stark K, Wilking H. Outbreak of *Cryptosporidium hominis* following river flooding in the city of Halle (Saale), Germany, August 2013. *BMC Infect Dis*. 2015; 15:88.
- Geurden T, Berkvens D, Martens C, Casaert S, Vercruyse J, Claerebout E. Molecular epidemiology with subtype analysis of *Cryptosporidium* in calves in Belgium. *Parasitology*. 2007; 134(14):1981–1987.
- Gillhuber J, Rügamer D, Pfister K, Scheuerle MC. Giardiasis and other enteropathogenic infections: a study on diarrhoeic calves in Southern Germany. *BMC Res Notes*. 2014; 7:112.
- Glaberman S, Moore JE, Lowery CJ, Chalmers RM, Sulaiman I, Elwin K, Rooney PJ, Millar BC, Dooley JSG, Lal AA, Xiao L. Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerging Infect Dis*. 2002; 8(6):631–633.
- Göhring F, Dauschies A, Lendner M. Subtypes and virulence of *Cryptosporidium parvum* in Germany. Proceedings ApiCOWplexa, International Meeting on Apicomplexan Parasites in farm animals, 2012 Oct 25-28, Lisbon, Portugal. Lissabon: Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa; 2012.
- Göhring F, Möller-Holtkamp P, Dauschies A, Lendner M. Untersuchungen zur Häufigkeit von *Cryptosporidium parvum* bei Durchfallkälbern und der Einfluss von Koinfektionen auf das Krankheitsgeschehen. *Tierarztl Umsch*. 2014; 4:112–120.
- Gold D, Stein B, Tzipori S. The Utilization of sodium taurocholate in excystation of *Cryptosporidium parvum* and infection of tissue culture. *J Parasitol*. 2001; 87(5):997–1000.
- Graczyk TK, Fayer R, Trout JM, Jenkins MC, Higgins J, Lewis EJ, Farley CA. Susceptibility of the Chesapeake Bay to environmental contamination with *Cryptosporidium parvum*. *Environ Res*. 2000; 82(2):106–112.

- Griffiths JK, Moore R., Dooley S, Keusch G., Tzipori S. *Cryptosporidium parvum* Infection of Caco-2 Cell Monolayers Induces an Apical Monolayer Defect, Selectively Increases Transmonolayer Permeability, and Causes Epithelial Cell Death. *Infect Immun.* 1994; 62(10):4506–4514.
- Gut J, Petersen C, Nelson R, Leech J. *Cryptosporidium parvum*: *in vitro* cultivation in Madin-Darby canine kidney cells. *J Protozool.* 1991; 38(6):72S-73S.
- Gyürék LL, Li H, Belosevic M, Finch GR. Ozone Inactivation Kinetics of *Cryptosporidium* in Phosphate Buffer. *J Environ Eng (New York).* 1999; 125(10):913–924.
- Halliday GM, Byrne SN, Damian DL. Ultraviolet A radiation: its role in immunosuppression and carcinogenesis. *Semin Cutan Med Surg.* 2011; 30(4):214–221.
- Harp JA, Fayer R, Pesch BA, Jackson GJ. Effect of pasteurization on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water and milk. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62(8):2866–2868.
- Heckler RP, Borges DGL, Bacha FB, Onizuka MKV, Teruya LeS, Neves JPL, Leal CRB, de Lemos, Ricardo Antônio Amaral, Meireles MV, Borges FdA. First genetic identification of *Cryptosporidium parvum* subtype IIAA14G2R1 in beef cattle in Brazil. *Prev Vet Med.* 2015; 121(3-4):391–394.
- Heine J. Eine einfache Nachweismethode für Kryptosporidien im Kot. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1982; 29(4):324–327.
- Heine J, Moon HW, Woodmansee DB, Pohlenz JF. Experimental tracheal and conjunctival infections with *Cryptosporidium* sp. in pigs. *Vet Parasitol.* 1984a; 17(1):17–25.
- Heine J, Pohlenz JF, Moon HW, Woode GN. Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species. *J Infect Dis.* 1984b; 150(5):768–775.
- Hijjawi NS, Meloni BP, Ng'anzo M, Ryan UM, Olson ME, Cox PT, Monis PT, Thompson RCA. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *Int J Parasitol.* 2004; 34(7):769–777.
- Hijjawi N, Meloni B, Morgan U, Thompson R. Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. *Int J Parasitol.* 2001; 31(10):1048–1055.
- Hijjawi N. *Cryptosporidium*: new developments in cell culture. *Exp Parasitol.* 2010; 124(1):54–60.

- Hikosaka K, Satoh M, Koyama Y, Nakai Y. Quantification of the infectivity of *Cryptosporidium parvum* by monitoring the oocyst discharge from SCID mice. *Vet Parasitol.* 2005; 134(1-2):173–176.
- Hoigné J. The Chemistry of Ozone in Water. In: Stucki S, Hrsg. *Process Technologies for Water Treatment. Earlier Brown Boveri Symposia. 1. Aufl.* Boston: Springer. 1988.
- Holton J, Nye P, McDonald V. Efficacy of selected disinfectants against Mycobacteria and Cryptosporidia. *J Hosp Infect.* 1994; 27(2):105–115.
- Horčíčková M, Čondlová Š, Holubová N, Sak B, Květoňová D, Hlásková L, Konečný R, Sedláček F, Clark M, Giddings C, McEvoy J, Kváč M. Diversity of *Cryptosporidium* in common voles and description of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. and *Cryptosporidium microti* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Parasitology.* 2019; 146(2):220–233.
- Hou L, Li X, Dunbar L, Moeller R, Palermo B, Atwill ER. Neonatal-mouse infectivity of intact *Cryptosporidium parvum* oocysts isolated after optimized in vitro excystation. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(1):642–646.
- Huang BQ, Chen X, LaRusso NF. *Cryptosporidium parvum* attachment to and internalization by human biliary epithelia in vitro: a morphologic study. *J Parasitol.* 2004; 90(2):212–221.
- Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(1):145–154.
- Hunter PR, Thompson RCA. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Int J Parasitol.* 2005; 35(11-12):1181–1190.
- Imre K, Lobo LM, Matos O, Popescu C, Genchi C, Dărăbuș G. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from pre-weaned calves in Romania: is there an actual risk of zoonotic infections? *Vet Parasitol.* 2011; 181(2-4):321–324.
- Innes EA, Bartley PM, Rocchi M, Benavidas-Silvan J, Burrells A, Hotchkiss E, Chianini F, Canton G, Katzer F. Developing vaccines to control protozoan parasites in ruminants: dead or alive? *Vet Parasitol.* 2011; 180(1-2):155–163.
- Iqbal J, Khalid N, Hira PR. Cryptosporidiosis in Kuwaiti children: association of clinical characteristics with *Cryptosporidium* species and subtypes. *J Med Microbiol.* 2011; 60(5):647–652.
- Jarvie BD, Trotz-Williams LA, McKnight DR, Leslie KE, Wallace MM, Todd CG, Sharpe PH, Peregrine AS. Effect of Halofuginone Lactate on the Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and Growth of Neonatal Dairy Calves. *J Dairy Sci.* 2005; 88(5):1801–1806.

- Jenkins M, Trout JM, Higgins J, Dorsch M, Veal D, Fayer R. Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. Parasitol Res. 2003; 89(1):1–5.
- Jenkins MB, Bowman DD, Ghiorse WC. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts by Ammonia. Appl Environ Microbiol. 1998; 64(2):784–788.
- Jenkins M, Higgins J, Kniel K, Trout J, Fayer R. Protection of calves against cryptosporiosis by oral inoculation with gamma-irradiated *Cryptosporidium parvum* oocysts. J Parasitol. 2004; 90(5):1178–1180.
- Jenkins MC, Trout J, Abrahamsen MS, Lancto CA, Higgins J, Fayer R. Estimating viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) directed at mRNA encoding amyloglucosidase. J Microbiol Methods. 2000; 43(2):97–106.
- Jenkins MB, Eaglesham BS, Anthony LC, Kachlany SC, Bowman DD, Ghiorse WC. Significance of wall structure, macromolecular composition, and surface polymers to the survival and transport of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Appl Environ Microbiol. 2010; 76(6):1926–1934.
- Joachim A, Eckert E, Petry F, Bialek R, Dauschies A. Comparison of viability assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts after disinfection. Vet Parasitol. 2003a; 111(1):47–57.
- Joachim A, Krull T, Schwarzkopf J, Dauschies A. Prevalence and control of bovine cryptosporidiosis in German dairy herds. Vet Parasitol. 2003b; 112(4):277–288.
- Johnson AM, Di Giovanni GD, Rochelle PA. Comparison of assays for sensitive and reproducible detection of cell culture-infectious *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* in drinking water. Appl Environ Microbiol. 2012; 78(1):156–162.
- Joung M, Yun S, Joung M, Park W, Yu J. Ultrastructural changes in *Cryptosporidium parvum* oocysts by gamma irradiation. Korean J Parasitol. 2011; 49(1):25–31.
- Kaneene JB, Scott Hurd H. The national animal health monitoring system in Michigan. III. Cost estimates of selected dairy cattle diseases. Prev Vet Med. 1990; 8(2-3):127–140.
- Karanis P, Aldeyarbi HM. Evolution of *Cryptosporidium in vitro* culture. Int J Parasitol. 2011; 41(12):1231–1242.
- Kato S, Jenkins MB, Fogarty EA, Bowman DD. Effects of freeze-thaw events on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in soil. J of Parasitol. 2002; 88(4):718–722.
- Kaupke A, Rzeżutka A. Emergence of novel subtypes of *Cryptosporidium parvum* in calves in Poland. Parasitol Res. 2015; 114(12):4709–4716.

- Keegan AR, Fanok S, Monis PT, Saint CP. Cell culture-Taqman PCR assay for evaluation of *Cryptosporidium parvum* disinfection. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(5):2505–2511.
- Keidel J, Dauschies A. Integration of halofuginone lactate treatment and disinfection with p-chloro-m-cresol to control natural cryptosporidiosis in calves. *Vet Parasitol.* 2013; 196(3-4):321–326.
- Kewitz S, Göhring F, Steinhöfel I, Dauschies A. Die Bedeutung von Kryptosporidien im Rahmen des neonatalen Durchfallgeschehens in sächsischen Milchviehbeständen. Tagungsband der DVG-Fachgruppe Parasitologie und Parasitäre Krankheiten; 2019 Jun 17-19; Leipzig, Deutschland. Gießen: Verlag der DVG Service GmbH; 2019. p. 115-118.
- Khan A, Shaik JS, Grigg ME. Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. *Acta Trop.* 2018; 184:1–14.
- Kim HC, Healey MC. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts Following Cryopreservation. *J Parasitol.* 2001; 87(5):1191–1194.
- King BJ, Hoefel D, Daminato DP, Fanok S, Monis PT. Solar UV reduces *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in environmental waters. *J Appl Microbiol.* 2008; 104(5):1311–1323.
- King BJ, Keegan AR, Phillips R, Fanok S, Monis PT. Dissection of the hierarchy and synergism of the bile derived signal on *Cryptosporidium parvum* excystation and infectivity. *Parasitology.* 2012; 139(12):1533–1546.
- King BJ, Keegan AR, Robinson BS, Monis PT. *Cryptosporidium* cell culture infectivity assay design. *Parasitology.* 2011; 138(6):671–681.
- Kinross P, Beser J, Troell K, Axén C, Silverlås C, Björkman C, Lebbad M, Winiacka-Krusnell J, Lindh J, Löfdahl M. *Cryptosporidium parvum* infections in a cohort of veterinary students in Sweden. *Epidemiol Infect.* 2015; 143(13):2748–2756.
- Kirby RM, Bartram J, Carr R. Water in food production and processing. *Food Control.* 2003; 14(5):283–299.
- Kistemann T, Rind E, Koch C, Claßen T, Lengen C, Exner M, Rechenburg A. Effect of sewage treatment plants and diffuse pollution on the occurrence of protozoal parasites in the course of a small river. *Int J Hyg Environ Health.* 2012; 215(6):577–583.
- Kniel KE, Sumner SS, Pierson MD, Zajac AM, Hackney CR, Fayer R, Lindsay DS. Effect of hydrogen peroxide and other protease inhibitors on *Cryptosporidium parvum* excystation and *in vitro* development. *J Parasitol.* 2004; 90(4):885–888.

- Kniel KE, Sumner SS, Lindsay DS, Hackney CR, Pierson MD, Zajac AM, Golden DA, Fayer R. Effect of organic acids and hydrogen peroxide on *Cryptosporidium parvum* viability in fruit juices. *J Food Prot.* 2003; 66(9):1650–1657.
- Korich D G, Marshall M M, Smith H V, O'Grady J, Bukhari Z., Fricker C R, Rosen J P, Clancy J L. Inter-laboratory Comparison of the CD-I Neonatal Mouse Logistic Dose-Response Model for *Cryptosporidium parvum* Oocysts. *J Eukaryot Microbiol.* 2000; 47(3):294–298.
- Korich D. G., Mead JR, Madore MS, Sinclair NA, Sterling CR. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Appl Environ Microbiol.* 1990; 56(5):1423–1428.
- Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, Wu Y, Sow SO, Sur D, Breiman RF, Faruque ASG, Zaidi AKM, Saha D, Alonso PL, Tamboura B, Sanogo D, Onwuchekwa U, Manna B, Ramamurthy T, Kanungo S, Ochieng JB, Omore R, Oundo JO, Hossain A, Das SK, Ahmed S, Qureshi S, Quadri F, Adegbola RA, Antonio M, Hossain MJ, Akinsola A, Mandomando I, Nhampossa T, Acácio S, Biswas K, O'Reilly CE, Mintz ED, Berkeley LY, Muhsen K, Sommerfelt H, Robins-Browne RM, Levine MM. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS). *Lancet.* 2013; 382(9888):209–222.
- Kuhls TL, Greeffield RA, Mosier DA, Crawford DL, Joyce WA. Cryptosporidiosis in adult and neonatal mice with severe combined immunodeficiency. *J Comp Pathol.* 1992; 106(4):399–410.
- Kuhnert-Paul Y, Bangoura B, Dittmar K, Dausgies A, Schmäscke R. Cryptosporidiosis: comparison of three diagnostic methods and effects of storage temperature on detectability of cryptosporidia in cattle faeces. *Parasitol Res.* 2012; 111(1):165–171.
- Kváč M, Hromadová N, Květoňová D, Rost M, Sak B. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned dairy calves in the Czech Republic: absence of *C. ryanae* and management-associated distribution of *C. andersoni*, *C. bovis* and *C. parvum* subtypes. *Vet Parasitol.* 2011; 177(3-4):378–382.
- Kváč M, Vlnatá G, Ježková J, Horčíčková M, Konečný R, Hlásková L, McEvoy J, Sak B. *Cryptosporidium occultus* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in rats. *Eur J Protistol.* 2018; 63:96–104.
- Le Goff L, Khaldi S, Favennec L, Nauleau F, Meneceur P, Perot J, Ballet J, Gargala G. Evaluation of water treatment plant UV reactor efficiency against *Cryptosporidium parvum*

- oocyst infectivity in immunocompetent suckling mice. *J Appl Microbiol.* 2010; 108(3):1060–1065.
- Leander BS, Clopton RE, Keeling PJ. Phylogeny of gregarines (Apicomplexa) as inferred from small-subunit rDNA and β -tubulin. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003; 53(1):345–354.
- Leav BA, Mackay MR, Anyanwu A, O' Connor RM, Cevallos AM, Kindra G, Rollins NC, Bennish ML, Nelson RG, Ward HD. Analysis of sequence diversity at the highly polymorphic *Cpyp40/15* locus among *Cryptosporidium* isolates from human immunodeficiency virus-infected children in South Africa. *Infect Immun.* 2002; 70(7):3881–3890.
- Lee S, Joung M, Nam T, Park W, Ji Y, Yu J. *Cryptosporidium parvum*: radiation-induced alteration of the oocyst proteome. *Exp Parasitol.* 2011; 127(1):25–30.
- Lee S, Joung M, Yang D, Park S, Huh S, Park W, Yu J. Pulsed-UV light inactivation of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitol Res.* 2008; 102(6):1293–1299.
- Lee S, Joung M, Nam T, Park W, Yu J. Quantitative evaluation of infectivity change of *Cryptosporidium parvum* after gamma irradiation. *Korean J Parasitol.* 2009; 47(1):7–11.
- Lee S, Joung M, Nam T, Park W, Yu J. Rejoining of gamma-ray-induced DNA damage in *Cryptosporidium parvum* measured by the comet assay. *Exp Parasitol.* 2010; 125(3):230–235.
- Lefay D, Naciri M, Poirier P, Chermette R. Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in suckling calves. *Vet Rec.* 2001; 148(4):108–112.
- Lendner M, Böttcher D, Delling C, Ojo KK, van Voorhis WC, Dauschies A. A novel CDPK1 inhibitor—a potential treatment for cryptosporidiosis in calves? *Parasitol Res.* 2015; 114(1):335–336.
- Li H, Gyürék LL, Finch GR, Smith DW, Belosevic M. Effect of Temperature on Ozone Inactivation of *Cryptosporidium parvum* in Oxidant Demand-Free Phosphate Buffer. *Journal Environ Eng.* 2001; 127(5):456–467.
- Li N, Xiao L, Cama VA, Ortega Y, Gilman RH, Guo M, Feng Y. Genetic recombination and *Cryptosporidium hominis* virulent subtype IbA10G2. *Emerging Infect Dis.* 2013; 19(10):1573–1582.
- Li X, Atwill ER, Dunbar LA, Jones T, Hook J, Tate KW. Seasonal Temperature Fluctuations Induces Rapid Inactivation of *Cryptosporidium parvum*. *Environ. Sci. Technol.* 2005; 39(12):4484–4489.

- Li X, Atwill ER, Dunbar LA, Tate KW. Effect of daily temperature fluctuation during the cool season on the infectivity of *Cryptosporidium parvum*. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76(4):989–993.
- Li X, Brasseur P, Agnamey P, Ballet JJ, Clemenceau C. Time and temperature effects on the viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in chlorinated tap water. *Arch Environ Health.* 2004; 59(9):462–466.
- Liang Z, Keeley A. Comparison of propidium monoazide-quantitative PCR and reverse transcription quantitative PCR for viability detection of fresh *Cryptosporidium* oocysts following disinfection and after long-term storage in water samples. *Water Res.* 2012; 46(18):5941–5953.
- Linden KG, Shin G, Sobsey MD. Comparative effectiveness of UV wavelengths for the inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. *Water Sci Technol.* 2001; 43(12):171–174.
- Lindsay DS, Upton SJ, Owens DS, Morgan UM, Mead JR, Blagburn BL. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J Eukaryot Microbiol.* 2000; 47(1):91–95.
- Liu J, Deng M, Lancto CA, Abrahamsen MS, Rutherford MS, Enomoto S. Biphasic modulation of apoptotic pathways in *Cryptosporidium parvum*-infected human intestinal epithelial cells. *Infect Immun.* 2009; 77(2):837–849.
- López-Vélez R, Tarazona R, Camacho AG, Gomez-Mampaso E, Guerrero A, Moreira V, Villanueva R. Intestinal and extraintestinal cryptosporidiosis in AIDS patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1995; 14(8):677–681.
- Lüder CG, Gross U, Lopes MF. Intracellular protozoan parasites and apoptosis. *Trends Parasitol.* 2001; 17(10):480–486.
- Lumadue JA, Manabe YC, Moore RD, Belitsos PC, Sears CL, Clark DP. A clinicopathologic analysis of AIDS-related cryptosporidiosis. *AIDS.* 1998; 12(18):2459–2466.
- Manque PA, Tenjo F, Woehlbier U, Lara AM, Serrano MG, Xu P, Alves JM, Smeltz RB, Conrad DH, Buck GA. Identification and immunological characterization of three potential vaccinogens against *Cryptosporidium* species. *Clin Vaccine Immunol.* 2011; 18(11):1796–1802.
- Mascaró C, Arnedo T, Rosales MJ. Respiratory cryptosporidiosis in a bovine. *J Parasitol.* 1994; 80(2):334–336.

- McCann R, Jones R, Snow J, Cleary P, Burgess S, Bothra V, Chalmers RM. An outbreak of cryptosporidiosis at a swimming club-can rapid field epidemiology limit the spread of illness? *Epidemiol Infect.* 2014; 142(1):51–55.
- McCole DF, Eckmann L, Laurent F, Kagnoff MF. Intestinal epithelial cell apoptosis following *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun.* 2000; 68(3):1710–1713.
- McGuigan KG, Méndez-Hermida F, Castro-Hermida JA, Ares-Mazás E, Kehoe SC, Boyle M, Sichel C, Fernández-Ibáñez P, Meyer BP, Ramalingham S, Meyer EA. Batch solar disinfection inactivates oocysts of *Cryptosporidium parvum* and cysts of *Giardia muris* in drinking water. *J Appl Microbiol.* 2006; 101(2):453–463.
- McKerr C, Adak GK, Nichols G, Gorton R, Chalmers RM, Kafatos G, Cosford P, Charlett A, Reacher M, Pollock KG, Alexander CL, Morton S. An Outbreak of *Cryptosporidium parvum* across England & Scotland Associated with Consumption of Fresh Pre-Cut Salad Leaves, May 2012. *PLoS One.* 2015; 10(5):e0125955.
- Mele R, Gomez Morales MA, Tosini F, Pozio E. *Cryptosporidium parvum* at different developmental stages modulates host cell apoptosis in vitro. *Infect Immun.* 2004; 72(10):6061–6067.
- Millard PS, Gensheimer KF, Addiss DG, Sosin DM, Beckett GA, Houck-Jankoski A, Hudson A. An Outbreak of Cryptosporidiosis From Fresh-Pressed Apple Cider. *JAMA.* 1994; 272(20):1592.
- Miller CN, Jossé L, Brown I, Blakeman B, Povey J, Yiangou L, Price M, Cinatl J, Xue W, Michaelis M, Tsaousis AD. A cell culture platform for *Cryptosporidium* that enables long-term cultivation and new tools for the systematic investigation of its biology. *Int J Parasitol.* 2018; 48(3-4):197–201.
- Misic Z, Abe N. Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from calves on farms around Belgrade, Serbia and Montenegro, using the 60 kDa glycoprotein gene sequences. *Parasitology.* 2007; 134(3):351–358.
- Morada M, Lee S, Gunther-Cummins L, Weiss LM, Widmer G, Tzipori S, Yarlett N. Continuous culture of *Cryptosporidium parvum* using hollow fiber technology. *Int J Parasitol.* 2016; 46(1):21–29.
- Morgan-Ryan UM, Fall A, Ward LA, Hijjawi N, Sulaiman I, Fayer R, Thompson RCA, Olson M, Lal A, Xiao L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J Eukaryot Microbiol.* 2002; 49(6):433–440.

- Morita S, Namikoshi A, Hirata T, Oguma K, Katayama H, Ohgaki S, Motoyama N, Fujiwara M. Efficacy of UV irradiation in inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(11):5387–5393.
- Murphy JL, Haas CN, Arrowood MJ, Hlavsa MC, Beach MJ, Hill VR. Efficacy of chlorine dioxide tablets on inactivation of *cryptosporidium* oocysts. *Environ Sci Technol.* 2014; 48(10):5849–5856.
- Naciri M, Mancassola R, Fort G, Danneels B, Verhaeghe J. Efficacy of amine-based disinfectant KENO™COX on the infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Vet Parasitol.* 2011; 179(1-3):43–49.
- Najdrowski M, Joachim A, Dauschies A. An improved *in vitro* infection model for viability testing of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Vet Parasitol.* 2007; 150(1-2):150–154.
- Neumann NF, Gyürék LL, Finch GR, Belosevic M. Intact *Cryptosporidium parvum* oocysts isolated after *in vitro* excystation are infectious to neonatal mice. *FEMS Microbiol Lett.* 2000; 183(2):331–336.
- Nocker A, Sossa KE, Camper AK. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *J Microbiol Methods.* 2007; 70(2):252–260.
- Nydam DV, Wade SE, Schaaf SL, Mohammed HO. Number of *Cryptosporidium parvum* oocysts or *Giardia* spp. cysts shed by dairy calves after natural infection. *Am J Vet Res.* 2001; 62(10):1612–1615.
- Okhuysen PC, Chappell CL, Crabb JH, Sterling CR, DuPont HL. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *J Infect Dis.* 1999; 180(4):1275–1281.
- Olvera M, Eguía A, Rodríguez O, Chong E, Pillai SD, Ilangovan K. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water using ultrasonic treatment. *Bioresour Technol.* 2008; 99(6):2046–2049.
- Ortega YR, Liao J. Microwave inactivation of *Cyclospora cayentanensis* sporulation and viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Food Prot.* 2006; 69(8):1957–1960.
- Owens JH, Miltner RJ, Rice EW, Johnson CH, Dahling DR, Schaefer FW, Shukairy HM. Pilot-Scale Ozone Inactivation of *Cryptosporidium* and Other Microorganisms in Natural Water. *Ozone Sc Eng.* 2000; 22(5):501–517.
- Oyane I, Furuta M, Stavarache CE, Hashiba K, Mukai S, Nakanishi M, Kimata I, Maeda Y. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* by Ultrasonic Irradiation. *Environ. Sci. Technol.* 2005; 39(18):7294–7298.

- Pancieria RJ, Thomassen RW, Garner FM. Cryptosporidial Infection in a Calf. *Vet Pathol.* 1971; 8(5-6):479–484.
- Pavlásek I. Studies on the life cycle of *Cryptosporidium* coccidia in experimentally infected chickens. *Folia Parasitol.* 1987; 34(3):193–197.
- Paziewska-Harris A, Schoone G, Schallig, H D F H. Long-Term Storage of *Cryptosporidium parvum* for In Vitro Culture. *J Parasitol.* 2018; 104(1):96–100.
- Pecková R, Stuart PD, Sak B, Květoňová D, Kváč M, Foitová I. Statistical comparison of excystation methods in *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Vet Parasitol.* 2016; 230:1–5.
- Peeters JE, Mazás EA, Masschelein WJ, Villacorta Martiez de Maturana, I, Debacker E. Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol.* 1989; 55(6):1519–1522.
- Perryman LE, Kapil SJ, Jones ML, Hunt EL. Protection of calves against cryptosporidiosis with immune bovine colostrum induced by a *Cryptosporidium parvum* recombinant protein. *Vaccine.* 1999; 17(17):2142–2149.
- Plutzer J, Karanis P. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. *Vet Parasitol.* 2007; 146(3-4):357–362.
- Plutzer J, Lassen B, Jokelainen P, Djurković-Djaković O, Kucsera I, Dorbek-Kolin E, Šoba B, Sréter T, Imre K, Omeragić J, Nikolić A, Bobić B, Živičnjak T, Lučinger S, Stefanović LL, Kučinar J, Sroka J, Deksne G, Keidāne D, Kváč M, Hůzová Z, Karanis P. Review of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the eastern part of Europe, 2016. *Euro Surveill.* 2018; 23(4).
- Pohlenz J, Bemrick WJ, Moon HW, Cheville NF. Bovine cryptosporidiosis: a transmission and scanning electron microscopic study of some stages in the life cycle and of the host-parasite relationship. *Vet Pathol.* 1978; 15(3):417–427.
- Pokorny NJ, Weir SC, Carreno RA, Trevors JT, Lee H. Influence of Temperature on *Cryptosporidium parvum* Oocyst Infectivity in River Water Samples as Detected by Tissue Culture Assay. *J Parasitol.* 2002; 88(3):641–643.
- Pozio E, Gomez Morales MA, Barbieri FM, La Rosa G. *Cryptosporidium*: Different behaviour in calves of isolates of human origin. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992; 86(6):636–638.
- Quílez J, Torres E, Chalmers RM, Robinson G, Del Cacho E, Sanchez-Acedo C. *Cryptosporidium* species and subtype analysis from dairy calves in Spain. *Parasitology.* 2008; 135(14):1613–1620.

- Quílez J, Sanchez-Acedo C, Avendaño C, del Cacho E, Lopez-Bernad F. Efficacy of two peroxygen-based disinfectants for inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(5):2479–2483.
- Rai AK, Chakravorty R, Paul J. Detection of *Giardia*, *Entamoeba*, and *Cryptosporidium* in unprocessed food items from northern India. *World J Microbiol Biotechnol.* 2008; 24(12):2879–2887.
- Rasmussen KR, Healey MC. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in immunosuppressed adult mice. *Infect Immun.* 1992; 60(4):1648–1652.
- Raue K, Heuer L, Böhm C, Wolken S, Epe C, Strube C. 10-year parasitological examination results (2003 to 2012) of faecal samples from horses, ruminants, pigs, dogs, cats, rabbits and hedgehogs. *Parasitol Res.* 2017; 116(12):3315–3330.
- Reduker DW, Speer CA. Factors influencing excystation in *Cryptosporidium* oocysts from cattle. *J Parasitol.* 1985; 71(1):112–115.
- Reinoso R, Becares E, Smith HV. Effect of various environmental factors on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Appl Microbiol.* 2008; 104(4):980–986.
- Rennecker JL, Kim J, Corona-Vasquez B, Mariñas BJ. Role of Disinfectant Concentration and pH in the Inactivation Kinetics of *Cryptosporidium parvum* Oocysts with Ozone and Monochloramine. *Environ. Sci. Technol.* 2001; 35(13):2752–2757.
- Rieux A, Chartier C, Pors I, Delafosse A, Paraud C. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from high-excreting young dairy calves in dairy cattle herds in Western France. *Parasitol Res.* 2013; 112(10):3423–3431.
- Rieux A, Paraud C, Pors I, Chartier C. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from beef calves under one month of age over three successive years in one herd in western France. *Vet Parasitol.* 2014; 202(3-4):171–179.
- Robert Koch-Institut (RKI). 2018a. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2017: 142,
<<https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuecher/2017.html?nn=2374622>>.
- Robert-Koch-Institut (RKI). 2018b. Tabellarische Jahresstatistik als Ergänzung zum Infektionsepidemiologischen Jahrbuch für 2017: 1,
<https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahresstatistik_2017.html>.
- Robertson LJ, Campbell AT, Smith HV. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Appl Environ Microbiol.* 1992; 58(11):3494–3500.

- Robertson LJ, Gjerde BK. Effects of the Norwegian winter environment on *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts. *Microb Ecol.* 2004; 47(4):359–365.
- Robertson LJ, Gjerde BK. Occurrence of Parasites on Fruits and Vegetables in Norway. *J Food Prot.* 2001; 64(11):1793–1798.
- Robinson G, Chalmers RM. Assessment of polymorphic genetic markers for multi-locus typing of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Exp Parasitol.* 2012; 132(2):200–215.
- Rochelle PA, Ferguson DM, Handojo TJ, Leon R de, Stewart MH, Wolfe RL. An assay combining cell culture with reverse transcriptase PCR to detect and determine the infectivity of waterborne *Cryptosporidium parvum*. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63(5):2029–2037.
- Rochelle PA, Fallar D, Marshall MM, Montelone BA, Upton SJ, Woods K. Irreversible UV Inactivation of *Cryptosporidium* spp. Despite the Presence of UV Repair Genes. *J Eukaryotic Microbiology.* 2004; 51(5):553–562.
- Rochelle PA, Marshall MM, Mead JR, Johnson AM, Korich DG, Rosen JS, de Leon R. Comparison of in vitro cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of *Cryptosporidium parvum*. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(8):3809–3817.
- Rosales MJ, Cifuentes J, Mascaró C. *Cryptosporidium parvum*: culture in MDCK cells. *Exp Parasitol.* 1993; 76(2):209–212.
- Rousseau A, La Carbona S, Dumètre A, Robertson LJ, Gargala G, Escotte-Binet S, Favennec L, Villena I, Gérard C, Aubert D. Assessing viability and infectivity of foodborne and waterborne stages (cysts/oocysts) of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii*: a review of methods. *Parasite.* 2018; 25:14.
- Ryan U, Hijjawi N. New developments in *Cryptosporidium* research. *Int J Parasitol.* 2015; 45(6):367–373.
- Ryu H, Gerrity D, Crittenden JC, Abbaszadegan M. Photocatalytic inactivation of *Cryptosporidium parvum* with TiO₂ and low-pressure ultraviolet irradiation. *Water Res.* 2008; 42(6-7):1523–1530.
- Sanford SE, Josephson GK. Bovine Cryptosporidiosis: Clinical and Pathological Findings in Forty-two Scouring Neonatal Calves. *Can Vet J.* 1982; 23(12):343–347.
- Santín M, Trout JM, Fayer R. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Vet Parasitol.* 2008; 155(1-2):15–23.
- Santín M, Trout JM, Xiao L, Zhou L, Greiner E, Fayer R. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet Parasitol.* 2004; 122(2):103–117.

- Santoro A, Dorbek-Kolin E, Jeremejeva J, Tummeleht L, Orro T, Jokelainen P, Lassen B. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* spp. in calves in Estonia: high prevalence of *Cryptosporidium parvum* shedding and 10 subtypes identified. *Parasitology*. 2019; 146(2):261–267.
- Sasahara T, Maruyama H, Aoki M, Kikuno R, Sekiguchi T, Takahashi A, Satoh Y, Kitasato H, Takayama Y, Inoue M. Apoptosis of intestinal crypt epithelium after *Cryptosporidium parvum* infection. *J Infect Chemother*. 2003; 9(3):278–281.
- Sassone LM, Fidel RAS, Murad CF, Fidel SR, Hirata R. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine by two different tests. *Aust Endod J*. 2008; 34(1):19–24.
- Sayed FG, Hamza AI, Galal LA, Sayed DM, Gaber M. Virulence of geographically different *Cryptosporidium parvum* isolates in experimental animal model. *Ann Parasitol*. 2016; 62(3):221–232.
- Schaefer DA, Betzer DP, Smith KD, Millman ZG, Michalski HC, Menchaca SE, Zambriski JA, Ojo KK, Hulverson MA, Arnold SLM, Rivas KL, Vidadala RSR, Huang W, Barrett LK, Maly DJ, Fan E, van Voorhis WC, Riggs MW. Novel Bumped Kinase Inhibitors Are Safe and Effective Therapeutics in the Calf Clinical Model for Cryptosporidiosis. *J Infect Dis*. 2016; 214(12):1856–1864.
- Shahiduzzaman M, Dyachenko V, Keidel J, Schmäschke R, Dauschies A. Combination of cell culture and quantitative PCR (cc-qPCR) to assess disinfectants efficacy on *Cryptosporidium* oocysts under standardized conditions. *Vet Parasitol*. 2010; 167(1):43–49.
- Shahiduzzaman M, Dyachenko V, Obwaller A, Unglaube S, Dauschies A. Combination of cell culture and quantitative PCR for screening of drugs against *Cryptosporidium parvum*. *Vet Parasitol*. 2009; 162(3-4):271–277.
- Shin GA, Linden KG, Arrowood MJ, Sobsey MD. Low-pressure UV inactivation and DNA repair potential of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol*. 2001; 67(7):3029–3032.
- Shivley CB, Lombard JE, Urie NJ, Koprak CA, Santin M, Earleywine TJ, Olson JD, Garry FB. Preweaned heifer management on US dairy operations: Part VI. Factors associated with average daily gain in preweaned dairy heifer calves. *J Dairy Sci*. 2018; 101(10):9245–9258.
- Silverlås C, Blanco-Penedo I. *Cryptosporidium* spp. in calves and cows from organic and conventional dairy herds. *Epidemiol Infect*. 2013; 141(3):529–539.
- Silverlås C, Bosaeus-Reineck H, Näslund K, Björkman C. Is there a need for improved *Cryptosporidium* diagnostics in Swedish calves? *Int J Parasitol*. 2013; 43(2):155–161.

- Silverlås C, Näslund K, Björkman C, Mattsson JG. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from Swedish dairy cattle in relation to age, diarrhoea and region. *Vet Parasitol.* 2010; 169(3-4):289–295.
- Singh J, Gill BS. Effect of gamma-irradiation on oocysts of *Eimeria necatrix*. *Parasitology.* 1975; 71(1):117–124.
- Slifko TR, Huffman DE, Rose JB. A most-probable-number assay for enumeration of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(9):3936–3941.
- Slifko TR, Raghubeer E., Rose J. B. Effect of High Hydrostatic Pressure on *Cryptosporidium parvum* Infectivity. *J Food Prot.* 2000; 63(9):1262–1267.
- Slifko TR, Huffman DE, Dussert B, Owens JH, Jakubowski W, Haas CN, Rose JB. Comparison of tissue culture and animal models for assessment of *Cryptosporidium parvum* infection. *Exp Parasitol.* 2002; 101(2-3):97–106.
- Smith HV, Nichols RAB, Grimason AM. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends Parasitol.* 2005; 21(3):133–142.
- Smith RP, Clifton-Hadley FA, Cheney T, Giles M. Prevalence and molecular typing of *Cryptosporidium* in dairy cattle in England and Wales and examination of potential on-farm transmission routes. *Vet Parasitol.* 2014; 204(3-4):111–119.
- Snodgrass DR, Terzolo HR, Sherwood D, Campbell I, Menzies JD, Synge BA. Aetiology of diarrhoea in young calves. *Vet Rec.* 1986; 119(2):31–34.
- Soliman A, El-Adawy A, Abd El-Aal AA, Elmallawany MA, Nahnoush RK, Eiaghni ARA, Negm MS, Mohsen A. Usefulness of Sunlight and Artificial UV Radiation Versus Chlorine for the Inactivation of *Cryptosporidium* Oocysts: An in Vivo Animal Study. *Open Access Maced J Med Sci.* 2018; 6(6):975–981.
- Spano F, Puri C, Ranucci L, Putignani L, Crisanti A. Cloning of the entire COWP gene of *Cryptosporidium parvum* and ultrastructural localization of the protein during sexual parasite development. *Parasitology.* 1997; 114(5):427–437.
- Sparks H, Nair G, Castellanos-Gonzalez A, White AC. Treatment of *Cryptosporidium*: What We Know, Gaps, and the Way Forward. *Curr Trop Med Rep.* 2015; 2(3):181–187.
- Stein B, Stover L, Gillem A, Winters K, Leet JH, Chauret C. The effect of lectins on *Cryptosporidium parvum* oocyst in vitro attachment to host cells. *J Parasitol.* 2006; 92(1):1–9.
- Strathmann M, Horstkott M, Koch C, Gayer U, Wingender J. The River Ruhr - an urban river under particular interest for recreational use and as a raw water source for drinking water: The

collaborative research project "Safe Ruhr" - microbiological aspects. *Int J Hyg Environ Health*. 2016; 219(7):643–661.

Strong WB, Gut J, Nelson RG. Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. *Infect Immun*. 2000; 68(7):4117–4134.

Sulaiman IM, Hira PR, Zhou L, Al-Ali FM, Al-Shelahi FA, Shweiki HM, Iqbal J, Khalid N, Xiao L. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(6):2805–2809.

Taylan-Ozkan A, Yasa-Duru S, Usluca S, Lysen C, Ye J, Roellig DM, Feng Y, Xiao L. *Cryptosporidium* species and *Cryptosporidium parvum* subtypes in dairy calves and goat kids reared under traditional farming systems in Turkey. *Exp Parasitol*. 2016; 170):16–20.

Thabet A, Zhang R, Alnassan A, Dauschies A, Bangoura B. Anticoccidial efficacy testing: *In vitro Eimeria tenella* assays as replacement for animal experiments. *Vet Parasitol*. 2017; 233):86–96.

Theodos CM, Griffiths JK, D'Onfro J, Fairfield A, Tzipori S. Efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in cell culture and in animal models. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(8):1959–1965.

Thompson HP, Dooley JSG, Kenny J, McCoy M, Lowery CJ, Moore JE, Xiao L. Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Northern Ireland. *Parasitol Res*. 2007; 100(3):619–624.

Thomson S, Hamilton CA, Hope JC, Katzer F, Mabbott NA, Morrison LJ, Innes EA. Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. *Vet Res*. 2017; 48(1):42.

Travaillé E, La Carbona S, Gargala G, Aubert D, Guyot K, Dumètre A, Villena I, Houssin M. Development of a qRT-PCR method to assess the viability of *Giardia intestinalis* cysts, *Cryptosporidium* spp. and *Toxoplasma gondii* oocysts. *Food Control*. 2016; 59:359–365.

Troeger C, Forouzanfar M, Rao PC, Khalil I, Brown A, Reiner RC, Fullman N, Thompson RL, Abajobir A, Ahmed M, Alemayohu MA, Alvis-Guzman N, Amare AT, Antonio CA, Asayesh H, Avokpaho E, Awasthi A, Bacha U, Barac A, Betsue BD, Beyene AS, Boneya DJ, Malta DC, Dandona L, Dandona R, Dubey M, Eshrati B, Fitchett JRA, Gebrehiwot TT, Hailu GB, Horino M, Hotez PJ, Jibat T, Jonas JB, Kasaeian A, Kissoon N, Kotloff K, Koyanagi A, Kumar GA, Rai RK, Lal A, El Razek, Hassan Magdy Abd, Mengistie MA, Moe C, Patton G, Platts-Mills JA, Qorbani M, Ram U, Roba HS, Sanabria J, Sartorius B, Sawhney M, Shigematsu M, Sreeramareddy C, Swaminathan S, Tedla BA, Jagiellonian RT, Ukwaja K, Werdecker A,

- Widdowson M, Yonemoto N, El Sayed Zaki M, Lim SS, Naghavi M, Vos T, Hay SI, Murray CJL, Mokdad AH. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17(9):909–948.
- Trotz-Williams LA, Martin DS, Gatei W, Cama V, Peregrine AS, Martin SW, Nydam DV, Jamieson F, Xiao L. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. *Parasitol Res.* 2006; 99(4):346–352.
- Tyzzar EE. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1907; 5(1):12–13.
- Tyzzar EE. An extracellular Coccidium, *Cryptosporidium Muris* (Gen. Et Sp. Nov.), of the gastric Glands of the Common Mouse. *J Med Res.* 1910; 23(3):487-510.3.
- Tzipori S, Widmer G. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends Parasitol.* 2008; 24(4):184–189.
- Upton SJ, Tilley M, Brillhart DB. Comparative development of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa) in 11 continuous host cell lines. *FEMS Microbiol Lett.* 1994; 118(3):233–236.
- Upton SJ, Tilley M, Brillhart DB. Effects of select medium supplements on in vitro development of *Cryptosporidium parvum* in HCT-8 cells. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(2):371–375.
- Valigurová A, Hofmannová L, Koudela B, Vávra J. An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. *J Eukaryot Microbiol.* 2007; 54(6):495–510.
- Valigurová A, Jirků M, Koudela B, Gelnar M, Modrý D, Slapeta J. Cryptosporidia: epicellular parasites embraced by the host cell membrane. *Int J Parasitol.* 2008; 38(8-9):913–922.
- Vassal S, Favennec L, Ballet JJ, Brasseur P. Hydrogen peroxide gas plasma sterilization is effective against *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Am J Infect Control.* 1998; 26(2):136–138.
- Venczel LV, Arrowood M, Hurd M, Sobsey MD. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Clostridium perfringens* spores by a mixed-oxidant disinfectant and by free chlorine. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63(4):1598–1601.
- Venczel LV, Likirdopulos CA, Robinson CE, Sobsey MD. Inactivation of enteric microbes in water by electro-chemical oxidant from brine (NaCl) and free chlorine. *Water Sci Technol.* 2004; 50(1):141–146.
- Vieira PM, Mederle N, Lobo ML, Imre K, Mederle O, Xiao L, Darabus G, Matos O. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* (Apicomplexa) in children and cattle in Romania. *Folia Parasitol.* 2015; 62:002.

- Vistica D. T., Shekan P., Scudiero D., Monks A., Pittman A., Boyd M. R. Tetrazolium-based Assays for Cellular Viability: A critical Examination of Selected Parameters Affecting Formazan Production. *Cancer Res.* 1991; 51(10):2515–2520.
- Waldron LS, Dimeski B, Beggs PJ, Ferrari BC, Power ML. Molecular epidemiology, spatiotemporal analysis, and ecology of sporadic human cryptosporidiosis in Australia. *Appl Environ Microbiol.* 2011a; 77(21):7757–7765.
- Waldron LS, Ferrari BC, Cheung-Kwok-Sang C, Beggs PJ, Stephens N, Power ML. Molecular epidemiology and spatial distribution of a waterborne cryptosporidiosis outbreak in Australia. *Appl Environ Microbiol.* 2011b; 77(21):7766–7771.
- Ward PI, Deplazes P, Regli W, Rinder H, Mathis A. Detection of eight *Cryptosporidium* genotypes in surface and waste waters in Europe. *Parasitology.* 2002; 124(4):359–368.
- Weir SC, Pokorny NJ, Carreno RA, Trevors JT, Lee H. Efficacy of common laboratory disinfectants on the infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cell culture. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(5):2576–2579.
- Wetzel DM, Schmidt J, Kuhlenschmidt MS, Dubey JP, Sibley LD. Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infect Immun.* 2005; 73(9):5379–5387.
- Widerström M, Schönning C, Lilja M, Lebbad M, Ljung T, Allestam G, Ferm M, Björkholm B, Hansen A, Hiltula J, Långmark J, Löfdahl M, Omberg M, Reuterwall C, Samuelsson E, Widgren K, Wallensten A, Lindh J. Large outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection transmitted through the public water supply, Sweden. *Emerging Infect Dis.* 2014; 20(4):581–589.
- Widmer G, Orbach EA, Tzipori S. β -tubulin mRNA as a marker of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(4):1584–1588.
- Widmer G, Sullivan S. Genomics and population biology of *Cryptosporidium* species. *Parasite Immunol.* 2012; 34(2-3):61–71.
- Widmer G, Tzipori S, Fichtenbaum CJ, Griffiths JK. Genotypic and phenotypic characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates from people with AIDS. *J Infect Dis.* 1998; 178(3):834–840.
- Wielinga PR, Vries A de, van der Goot, Tjeerd H, Mank T, Mars MH, Kortbeek LM, van der Giessen, Joke W B. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. *Int J Parasitol.* 2008; 38(7):809–817.
- Wilson JA, Margolin AB. The efficacy of three common hospital liquid germicides to inactivate *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Hosp Infect.* 1999; 42(3):231–237.

- Wilson J, Margolin AB. Efficacy of glutaraldehyde disinfectant against *Cryptosporidium parvum* in the presence of various organic soils. J AOAC Int. 2003; 86(1):96–100.
- Wilson WD, Tanious FA, Barton HJ, Jones RL, Fox K, Wydra RL, Streckowski L. DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Biochemistry. 1990; 29(36):8452–8461.
- Windeyer MC, Leslie KE, Godden SM, Hodgins DC, Lissemore KD, LeBlanc SJ. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. Prev Vet Med. 2014; 113(2):231–240.
- Woodmansee DB, Pohlenz JFL. Development of *Cryptosporidium* sp. in a human rectal tumor cell line. Proceedings of the Fourth International Symposium on Neonatal Diarrhea; 1983 Oct 3-5; University of Saskatchewan, Canada. Saskatoon: Veterinary Infectious Disease Organization; 1984.
- Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, Fayer R, Lal AA. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. Appl Environ Microbiol. 1999a; 65(4):1578–1583.
- Xiao L, Morgan UM, Limor J, Escalante A, Arrowood M, Shulaw W, Thompson RC, Fayer R, Lal AA. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. Appl Environ Microbiol. 1999b; 65(8):3386–3391.
- Xiao L, Ryan UM. Tools for Population Genetic Studies: MLT and MLST. In: Fayer R, Xiao L Hrsg. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. 2. Aufl. Boca Raton, Fla.: CRC Press/Taylor & Francis; 2008. p. 127.
- Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. Clin Microbiol Rev. 2004; 17(1):72–97.
- Xiao L, Feng Y. Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. Food Waterborne Parasitol. 2017; 8-9:14–32.
- Yang S, Healey MC, Du C, Zhang J. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in bovine fallopian tube epithelial cells. Infect Immun. 1996; 64(1):349–354.
- Yang S, Benson SK, Du C, Healey MC. Infection of Immunosuppressed C57BL/6N Adult Mice with a Single Oocyst of *Cryptosporidium parvum*. J Parasitol. 2000; 86(4):884.
- Yoon S, Yu J. Comparison of resistance to γ -irradiation between *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris* using in vivo infection. Korean J Parasitol. 2011; 49(4):423–426.
- Yu JR, Choi SD, Kim YW. In vitro infection of *Cryptosporidium parvum* to four different cell lines. Korean J Parasitol. 2000; 38(2):59–64.

- Yu JR, Park WY. The Effect of γ -Irradiation on the Viability of *Cryptosporidium parvum*. J Parasitol. 2003; 89(3):639–642.
- Zahedi A, Gofton AW, Jian F, Papparini A, Oskam C, Ball A, Robertson I, Ryan U. Next Generation Sequencing uncovers within-host differences in the genetic diversity of *Cryptosporidium gp60* subtypes. Int J Parasitol. 2017; 47(10-11):601–607.
- Zahedi A, Papparini A, Jian F, Robertson I, Ryan U. Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: Critical insights into better drinking water management. Int J Parasitol Parasites Wildl. 2016; 5(1):88–109.
- Zambriski JA, Nydam DV, Wilcox ZJ, Bowman DD, Mohammed HO, Liotta JL. *Cryptosporidium parvum*: determination of ID₅₀ and the dose-response relationship in experimentally challenged dairy calves. Vet Parasitol. 2013; 197(1-2):104–112.
- Zhu G, Keithly JS, Philippe H. What is the phylogenetic position of *Cryptosporidium*? Int J Syst Evol Microbiol. 2000; 50(4):1673–1681.
- Zimmer J, Slawson R, Huck P. Inactivation and potential repair of *Cryptosporidium parvum* following low- and medium-pressure ultraviolet irradiation. Water Res. 2003; 37(14):3517–3523.
- Zucker B. Kompendium der Tierhygiene. 5. Aufl. Berlin: Lehmanns Media GmbH; 2017.

Danksagung

An erster Stelle gilt ein großer Dank Prof. Dr. Arwid Dauschies für die Überlassung und die wissenschaftliche Betreuung des Dissertationsthemas, die konstruktive Hilfe bei der Bearbeitung der Manuskripte für die Publikationen und die kritische Durchsicht der Dissertationsschrift.

Vielen Dank auch an den Verfasser/die Verfasserin des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. Matthias Lendner danke ich für die ursprüngliche Projektidee und für die Einführung in die praktischen Tätigkeiten im Labor.

Vielen Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, sowie Doktorandinnen und Doktoranden des Instituts für Parasitologie für die fachliche Hilfe und moralische Unterstützung. Dabei danke ich ganz besonders Dr. Cora Delling und Lysanne Hiob für die gegenseitige Motivation und die sehr gute, freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor und am Schreibtisch.

Ein besonders lieber Dank gilt meiner Familie für die Unterstützung während des Studiums und dafür, dass sie immer für mich da ist. Lieber Christian, Danke für das stets offene Ohr und deinen immer währenden Optimismus.